Die Interaktion von Actinomycin D und Gammastrahlen bei HAK-Zellen

Axel Steuer

1983

Aus dem Strahlenbiologischen Institut der Universität München

Komm. Leiter: Prof.Dr.med. G. Riethmüller

Die Interaktion von Actinomycin D und Gammastrahlen bei HAK-Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Axel Steuer
aus München

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. K.R. Trott
Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. G. Riethmüller
Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.5.1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Arbeitsweise	2
2.1.	Material	2
2.1.1.	Zelltyp	2
2.1.2.	Medium	2
2.1.3.	Spüllösung nach Hank	3
2.1.4.	Färbelösung Methylenblau	3
2.1.5.	Solution A	3
2.1.6.	Trypsinlösung	4
2.1.7.	Zytostatikum	4
2.1.8.	Bestrahlungsquelle	4
2.2.	Arbeitsweise	4
2.2.1.	Arbeitsplatz	4
2.2.2.	Zellpassage	5
2.2.3.	Kolonieausbeute	6
3.	Durchführung der Versuche	7
3.1.	Bestimmung der Strahlendosiseffekt-kurve von HAK-Zellen bei Bestrahlung mit Gammastrahlen	7
3.2.	Ermittlung der Zeit-Überlebensrate--Konzentrationsbeziehung	8
3.3.	Ergebnisse der Teilversuche	9
3.3.1.	Strahlendosiseffektkurve	9
3.3.2.	Überlebensrate in Abhängigkeit von der Konzentration bei verschiedenen Expositionszeiten	9
3.3.3.	Überlebensrate in Abhängigkeit von der Expositionszeit bei verschiedenen Konzentrationen	10

3.4.	Interaktion von Act D und Bestrahlung bei verschiedenen Behandlungsintervallen	10
3.5.	Ergebnisse der Kombinationsversuche	11
4.	Diskussion	37
4.1.	Act D und seine Wirkung	37
4.1.1.	Struktur von Act D	37
4.1.2.	Biochemische Wirkungsweise	38
4.1.3.	Klinische Anwendung von Act D	39
4.1.4.	Nebenwirkungen von Act D	41
4.1.5.	Act D und Strahlentherapie	42
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	44
4.2.1.	Strahlendosiseffektkurve	44
4.2.2.	Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung	47
4.2.3.	Kombinationsversuche	50
4.2.3.1.	Beschreibung der Ergebnisse	50
4.2.3.2.	Interaktion von Act D und Bestrahlung	53
5.	Zusammenfassung	57
	Literatur	58

1. Einleitung

Neben einem chirurgischen Vorgehen besteht die Behandlung von Tumoren heutzutage vorwiegend in einer Strahlentherapie oder einer Zytostatischen Behandlung. Kenntnisse nicht nur der Biochemie, Pharmakologie und Pharmakinetik, sondern auch Einsicht in die Wirkungen auf Zellebene und Generationszyklus der Zellen sind dabei Voraussetzung zur sinnvollen klinischen Anwendung von Zytostatika und deren größtmöglichen Wirkung auf den Tumor.

Neben der Poly-Chemotherapie gewinnt die Kombination einer Chemotherapie mit Strahlentherapie zunehmend an Interesse. Hinsichtlich der Substanzen, der Dosierung und der zeitlichen Frequenz bestehen zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten, so daß die gewonnenen Daten dieser, an gesunden menschlichen Nierenzellen unternommenen Experimente, nur ein Mosaikstein in der künftigen Tumortherapie darstellen können.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Zelltyp

Die Versuche wurden mit gesunden menschlichen Nierentubulusepithelzellen, Human Adult Kidney (Kurzbezeichnung HAK) durchgeführt. Die ursprünglich von Chang isolierten Zellen waren im Labor eingefroren vorrätig. Die Verdoppelungszeit der Zellen beträgt 20 - 24 h; die Zellen wurden einmal in der Woche in ein frisches Nährmedium passagiert.

2.1.2. Medium

Das Nährmedium bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium und Hank's Salzlösung, wobei 10% viren- und mycoplasmenfreies Kälberserum zugegeben war.

Tabelle I :

Zusammensetzung	mg/l		
L-Arginin	105.0	Cholinchlorid	1.0
L-Cystin	24.0	Folsäure	1.0
L-Glutamin	292.0	I-Inosit	2.0
L-Histidin	31.0	Nicotinamid	1.0
L-Isoleucin	52.5	D-Panthothensäure-	
L-Leucin	52.4	Ca-Salz	1.0
L-Lysin	58.0	Pyridoxal HCl	1.0
L-Methionin	15.0	Riboflavin	0.1
L-Phenylalanin	32.0	Thiamin HCl	1.0
L-Threonin	48.0	$NaHCO_3$	350.0
L-Trytophan	10.0	Neomycinsulfat	100.0
L-Tyrosin	36.0	NaOH 1n	2 ml
L-Valin	46.0	+ Hank's Salzlösung wie in 2.1.3 angegeben	

2.1.3. Spüllösung nach Hank

Bestandteile der Lösung pro 1:

Zusammensetzung	mg/l
NaCl	8000.0
KCl	400.0
Na_2HPO_4 $2H_2O$	60.0
KH_2PO_4	60.0
$MgSO_4$ 7 H_2O	200.0
$CaCl_2$ wasserfrei	140.0
Glucose	1000.0
Phenolrot	10.0

2.1.4. Färbelösung Methylenblau

Diese Lösung besteht aus Methylenblau gesättigt in 150 ml Äthylalkohol, 500 ml Aqua dest. und 5 ml 1% - KOH Lösung.

2.1.5. Solution A

Bestandteile der Lösung pro 1 Aqua dest.:

Zusammensetzung	mg/l
NaCl	330
KCl	400
$NaHCO_3$	350
$NaHPO_4$ $2H_2O$	60
KH_2PO_4	60
Phenolrot	20

2.1.6. Trypsinlösung

2 g Trypsin in 1000 ml Solution A.

2.1.7. Zytostatikum

Es wurde Act D (Handelsname Lyovac-Cosmegen) der Firma Sharp & Dohme GmbH verwendet. Jede Ampulle enthält 0.5 mg Act D als lyophilisiertes Pulver und 20.0 mg Mannit. Der Inhalt wurde in 1 ml sterilem Aqua bidest unter sterilen Kautelen gelöst.

2.1.8. Bestrahlungsquelle

Für die Bestrahlungsversuche stand eine Cs^{137}-Quelle zur Verfügung (Dosisleistung 1,2 Gy/min). In einem geschlossenen System werden zwei opponierende Quellen mit Beginn der Bestrahlung durch Druckluft in die Bestrahlungsposition geschoben.

2.2. Arbeitsweise

2.2.1. Arbeitsplatz

Sämtliche Arbeiten wurden unter keimfreien Bedingungen an der Reinluftbank (Laminar Flow Bank) durchgeführt. Zusätzlich wurde die Arbeitsfläche durch kurzwellige UV-Strahlung in der arbeitsfreien Zeit sterilisiert. Arbeitsmaterialien wie Lösungen, Pipetten, Glaskolben, Reagenzgläser etc. waren ebenfalls steril.

2.2.2. Zellpassage

Zur Zellkultivierung, wie auch für die Versuche, wurden Vierkantflaschen aus Glas verwendet, welche mit Aluminiumfolien steril verschlossen waren. Die benötigten Lösungen mußten vor Versuchsbeginn im Warmwasserbad auf 37°C vorgewärmt werden.
Um die Zellkultur in eine frische Nährlösung überführen zu können, wurde das alte Medium abgegossen. Anschließend gab man für 5 min 5 ml Solution A zu, um die zweiwertigen Ca-Ionen aus dem Zellrasen zu waschen und somit die Voraussetzung zur vollständigen Wirkung der anschließend zu verwendenden Trypsinlösung zu schaffen.
Nach Absaugen von Solution A, ließ man 2 ml Trypsinlösung 7 min lang auf die Zellen einwirken. Die Vierkantflasche wurde während der Einwirkzeiten auf eine auf 37°C vorgeheizte Laborplatte gestellt.
Mit Ende der Einwirkzeit hatte sich der Zellrasen von der Glasunterfläche der Flasche gelöst und konnte nun durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausblasen mit einer 1 ml Pipette in eine Einzelsuspension überführt werden.
Diese Einzelsuspension wurde durch Zugabe von Eagle's Minimum Essential Medium 1:10 verdünnt und die Zellkonzentration in der Bürkerzählkammer ermittelt. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe ließ sich für die Versuche jede gewünschte Zellkonzentration herstellen, wobei zur Weiterkultivierung jeweils 50 000 und 100 000 Zellen, zusammen mit 9 ml Eagle's Medium, in Vierkantflaschen gegeben wurde.
Die nach sorgfältigem Abflammen steril verschlossenen Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C in einem 5% feuchten CO_2-Luft-Milieu und pH 7.2 inkubiert.
Nach 8 Tagen mußte zur Weiterführung der Zellkultur erneut in oben geschilderter Weise passagiert werden, um ein Ablösen der Zellen und damit ihr Absterben zu verhindern.

2.2.3. Kolonieausbeute

Parallel zu allen Versuchen wurden die aus der Passage gewonnenen Zellen so verdünnt, daß sich neben den für die Einsaat gewünschten Konzentrationen auch jeweils 200 Zellen in 1 ml Lösung befanden. Zusammen mit 9 ml Eagle's Medium wurden jeweils 4 Kulturflaschen mit 200 Zellen beschickt und dann 8 Tage bebrütet, wobei sich in dieser Zeit aus jeder intakten, teilungsfähigen Zelle eine Kolonie ausbildete.

Dieses Vorgehen war nötig, um einen Standardwert, die plating efficiency oder PE, zu erhalten. Dieser Wert (Verhältnis von gezählten Kolonien zur Zahl der eingesäten Zellen) gibt Auskunft darüber, wieviele Zellen pro Flasche überleben und ist nicht zuletzt ein Maß für die Genauigkeit, mit der bei der Zählung und beim Verdünnen vorgegangen wurde.
Die angesetzten Flaschen wurden nach Ablauf der 8-tägigen Inkubationszeit aus dem Brutschrank genommen. Nach Abkühlung wurde das überstehende Medium abgegossen und die Kolonien mit Methylenblau gefärbt.
Alle Kolonien, bestehend aus mehr als 50 Einzelzellen, wurden bei jeder Flasche unter dem Stereomikroskop ausgezählt und danach die PE wie oben beschrieben bestimmt. In gleicher Weise wurden Färbevorgang und Versuchsauszählung bei allen Experimenten durchgeführt.

3. Durchführung der Versuche

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Interaktion von Act D und Gammastrahlen bei HAK-Zellen zu untersuchen. Voraussetzung zur Durchführung der Kombinationsversuche mit unterschiedlichen Act D -Konzentrationen und unterschiedlichen Strahlenexpositionszeiten waren die Bestimmung der Strahlendosiswirkungskurve als auch die Ermittlung der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung. Aus den Ergebnissen dieser Bestimmungen ließ sich in etwa abschätzen, welche Einsaaten gewählt werden mußten, um bei den jeweiligen Kombinationsversuchen noch akzeptable Überlebensraten zu erhalten.

3.1. Bestimmung der Strahlendosiseffektkurve von HAK-Zellen

Während einer normalen Passage ließen sich Zellen für diese Versuche in beschriebener Weise gewinnen. Dabei wurden in die verschiedenen Flaschen jeweils 200 bis 5000 Zellen in 10 ml Eagle's Medium gegeben und über Nacht bebrütet, um den Zellen ein Anwachsen auf dem Flaschenboden zu ermöglichen. Am folgenden Tag wurden die Flaschen dem Brutschrank entnommen und mit Strahlendosen von 2 Gy bis 20 Gy bestrahlt. Nach achttägiger Inkubationszeit erfolgte die Färbung mit Methylenblau und die Auszählung unter dem Mikroskop. In Tabelle II sind Bestrahlungsdosen, Zelleinsaat und Überlebensraten dargestellt, wobei die Ergebnisse der Kontrollbestrahlungen in den Kombinationsversuchen hier nicht mit aufgeführt sind.

3.2. Ermittlung der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung

Die Ausführung dieser Experimente hatte zur Absicht, die Überlebensrate von HAK-Zellen nach verschiedenen Einwirkzeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Act D festzustellen. Die Expositionszeiten betrugen dabei 2h, 4h, 8h und 24h, während sich die Act D -Konzentrationen zwischen 0.1 µg/ml und 1.0 µg/ml bewegten. Bei den Versuchen wurde dergestalt vorgegangen, daß für ein Inkubationsintervall verschiedene Konzentrationen sowie eine Kontrolle angesetzt wurden. Jeder Versuchswert ergab sich aus wenigstens 4 angesetzten Flaschen. Die nach bekannter Methode gewonnenen Zellen wurden in jeweils 9 ml Eagle's Medium eingesät und wiederum über Nacht inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurde den Flaschen Act D in der entsprechenden Konzentration zugesetzt. Dazu mußte eine Ampulle Act D mit 0.5 mg in 1 ml sterilem Aqua bidest gelöst und eine Verdünnungsreihe mit Hank's Salzlösung erstellt werden, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten. Hierbei war es äußerst wichtig, genau zu pipettieren, um Verdünnungsfehler so gering wie nur möglich zu halten. Weiterhin erforderte das Zugeben des Zytostatikums eine genaue zeitliche Abfolge, da nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit jede Flasche zweimal mit Hank's Salzlösung gespült werden mußte, um keine Reste von Act D in der Flasche zu belassen. Nach dem Spülvorgang wurde jeder Flasche 10 ml frisches Eagle's Medium zugesetzt und für 8 - 10 Tage im Brutschrank belassen. Danach erfolgte die Färbung mit Methylenblau und die Bestimmung der über-

lebenden Kolonien nach bekannter Methode. Die Ergebnisse sind in Tabelle III aufgeführt.

3.3. Ergebnisse der Teilversuche

3.3.1. Strahlendosiswirkungskurve

Bei halblogarithmischer Darstellung zeigt sich eine typische Dosiswirkungskurve mit einer Schulter und Übergang in eine Gerade (Abb. 1). Die D_0, d. h. diejenige Dosis die im geraden Kurvenverlauf den Anteil der jeweils noch überlebenden Zellen auf 37% reduziert, beträgt 2,3 Gy. Verlängert man die Gerade in Richtung Ordinate, so ergibt sich als Schnittpunkt eine Extrapolationszahl (n) von 21. Nach einer Strahlendosis von 7 Gy überleben 50% der Zellen und nach 15 Gy noch etwa 3%.

3.3.2. Überlebensrate in Abhängigkeit von der Konzentration bei verschiedenen Expositionszeiten

In Abb. 2 wurde die Beziehung zwischen Überlebensrate und Konzentration bei Einwirkzeiten von 2h, 4h, 8h und 24h in halblogarithmischem Maßstab aufgetragen. Eingezeichnet sind jeweils die Einzelversuche. Act D vermindert danach die Überlebensrate der HAK-Zellen nach einer Exponentialfunktion. Mit Zunahme der Konzentration ist eine deutliche Abnahme der Überlebensrate verbunden. Nach einer zweistündigen Exposition mit 0,5 µg/ml überleben noch etwa 40%, nach einer zweistündigen Exposition mit 1.0 µg/ml 3% der Zellen.

3.3.3. Überlebensrate in Abhängigkeit von der Expositionszeit bei verschiedenen Konzentrationen

Abb. 3 veranschaulicht die Beziehung zwischen Überlebensrate und Expositionszeit bei den Konzentrationen von 0,1 µg/ml bis 0.75 µg/ml in halblogarithmischem Maßstab. Die einer Regressionsanalyse unterworfenen Ergebnisse (Tab. IV) zeigen ebenfalls eine Abnahme der Überlebensrate der HAK-Zellen nach einer Exponentialfunktion. Die Geraden werden mit zunehmender Konzentration steiler, wobei die D_0, d.h. diejenige Zeit, die den Anteil der jeweils noch überlebenden Zellen auf 37% reduziert, von 6h bei 0,25 µg/ml auf 2h bei 0,5 µg/ml und 1h bei 0.75 µg/ml extrazellulärer Act D-Konzentration abnimmt.

3.4. Interaktion von Act D und Bestrahlung bei verschiedenen Behandlungsintervallen.

Während den bisher beschriebenen Versuchen jeweils nur eine Behandlungsart, entweder Bestrahlung oder die zytostatische Wirkung von Act D, zugrunde lag, wurde nun versucht, beide Behandlungsmodalitäten zu kombinieren. Dabei wurden die HAK-Zellen bei allen Versuchen für 2h jeweils den Act D-Konzentrationen von 0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml ausgesetzt (siehe 3.2.) und nach behandlungsfreien Intervallen von 1 - 24 h mit jeweils 5 Gy, bzw. 10 Gy bestrahlt. Darüberhinaus wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle unbehandelter Zellen (PE), eine Kontrolle nur mit 5 und 10 Gy bestrahlter Zellen sowie eine Kontrolle nur für 2h mit 0,5 µg/ml und 1.0 µg/ml

Act D behandelter Zellen angesetzt. Im einzelnen wurde jedem behandlungsfreien Intervall die beiden Konzentrationen 0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml zugeordnet und nach zweistündiger Vorbehandlung mit Act D mit jeweils 5 Gy und 10 Gy bestrahlt. Die erforderlichen Zelleinsaaten konnten in etwa nach den Ergebnissen der Strahlendosiseffektkurve sowie den Ergebnissen der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung abgeschätzt werden. Trotzdem waren Vorversuche nötig, um verwertbare Versuchsergebnisse zu erhalten und ebenso war es nötig, eine zeitliche Koordination zu erreichen, da die zweistündige Vorbehandlung mit Act D als auch die behandlungsfreien Intervalle bei jedem Versuchsansatz exakt eingehalten werden mußten. Soweit dies nicht geschehen ist, sind die Ergebnisse jener Versuche nicht berücksichtigt worden.

3.5. Ergebnisse der Kombinationsversuche

In Tabelle V sind die Einzelexperimente zur Bestimmung der Interaktion von Act D und Bestrahlung aufgeführt. In der ersten Spalte ist die jeweilige Zellpassage-Nummer mit zugehörigem Datum angegeben, sowie das Intervall zwischen Act D -Exposition und Bestrahlungen. Die zweite Spalte zeigt die zu dem Versuch gehörige PE, die Überlebensrate der unbehandelten Zellen. Darauf folgt in Spalte Nr. 3 die Angabe der untersuchten Act D -Konzentrationen, wobei zuerst die Kontrolle der nur mit 0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml Act D behandelten Zellen angegeben ist und dann die zu jedem Intervall gehörigen Konzentrationen. Spalte Nr. 4 gibt die verab-

reichten Strahlendosen an; auch hier zuerst die Kontrolle nur bestrahlter Zellen und dann die während der Versuche verwendeten Dosen bei den jeweiligen Konzentrationen. Nach der in Spalte Nr. 5 angegebenen Zelleinsaathöhen folgen in der sechsten Spalte die Ergebnisse der Kolonieausbeute und in Spalte Nr. 7 das arithmetische Mittel dieser Werte. In Spalte Nr. 8 sind für alle Werte die Überlebensraten behandelter Zellen aufgeführt. (Berechnung siehe Formel in Tab. III) Aus der letzten Spalte lassen sich jene Überlebensraten entnehmen, die sich nach Umrechnung der Überlebensraten aus Spalte 8 auf die jeweilige Kontrolle nur mit 0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml Act D -Konzentration behandelter Zellen ergeben.

Bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb. 4 - Abb. 9) wurde so verfahren, daß für jeden Versuch ein festes Symbol gewählt wurde, wobei die Kurven für 0.5 µg/ml Act D -Konzentration gestrichelt und jene für 1.0 µg/ml durchgezogen gezeichnet wurden. Die Versuchssymbole im einzelnen:

-▽- HAK 52; - o - HAK 55; -▼- HAK 77;
-□- HAK 81; -■- HAK 82; -●- HAK 85;

Tabelle II: Darstellung der Versuchsergebnisse zur Strahlendosiseffektkurve

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute			Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)
HAK 41	24.1.80	74	-	300	213	231		222	100
			2	300	204	216	199	206	92.7
			4	1000	553	507	537	532	71.9
			6	1000	441	405	487	444	60.0
HAK 44	12.2.80	41	-	200	89	84	74	82	100
			3	500	182	188	208	192	93.9
			6	1000	258	261	231	250	60.9
			9	2000	263	332	261	285	34.8
			12	4000	241	297	191	243	14.8
			15	5000	68	87	54	70	3.4

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)
HAK 48	7.3.80	67.2	-	200	122	132	154	130	134.5	100
			5	500	251	249	233	265	249.5	74.5
			10	1000	134	111	159	204	152	22.7
			12.5	3000	113	102	110	153	119.5	5.9
			15	5000	57	53	72	54	59	1.8
			17.5	5000	29	22	25	21	24	0.71
			20	5000	19	14	14	13	15	0.44
HAK 50	18.3.80	49	-	200	93	107	87	105	98	100
			5	500	178	203	181	198	190	77.5
			10	1000	137	130	134	149	137.5	28.0
			15	3000	34	47	53	46	45	3.0
HAK 52	31.3.80	46	-	200	94	92	100	82	92	100
			3	200	58	72	78	71	70	75.8
			5	500	154	177	157	152	160	69.5
			10	1000	119	127	113	116	119	25.8
			15	3000	49	65	64	51	57	4.1

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-werte X	Überlebens-rate (%)
HAK 55	24.4.80	65	-	200	129	122	127	142	130	100
			5	500	254	281	224	242	250	77.0
			8	1000	362	379	357	348	361.5	55.0
			12	3000	241	225	227	271	241	12.3
			15	3000	68	64	51	81	66	3.4
			17	5000	47	25	39	53	41	1.3
HAK 56	28.4.80	51	-	200	97	88	109	114	102	100
			3	200	83	77	74	94	82	80.3
			5	500	192	204	182	204	195.5	76.6
			10	1000	157	201	159	184	175	34.4
			12	3000	249	273	245	274	260	17.0
			15	3000	56	52	57	49	53.5	3.5
HAK 62	15.6.80	36.5	-	200	55	82	72	83	73	100
			3	200	73	49	69	53	61	83.5
			5	500	147	119	139	120	131	72.9
			10	1000	74	110	95	57	84	23.0
			12	3000	71	91	93	103	90	8.1
			15	3000	12	21	15	14	15.5	1.4

Tabelle III: Aufführung der Einzelversuchsergebnisse zur Bestimmung der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Act D-Konz. (µg/ml)	Einsaat	Kolonieausbeute 2h Act D Exposition				Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)
HAK 35	13.12.79	70	-	200	147	141	134	138	140	100
			0.1	500	274	270	304	266	278.5	79.5
			0.5	500	131	94	93	134	113	32.2
			1.0	500	5	24	10	9	12	3.4
HAK 43	6.2.80	42.5	-	200	99	80	90	71	85	100
			0.1	500	212	186	199	163	190	89.4
			0.25	500	132	159	129	161	145	68.2
			0.5	500	107	127	92	94	105	49.4
			0.75	500	19	10	11	12	13	6.1
			1.0	1000	16	19	11	9	14	3.3
HAK 49	11.3.80	47	-	200	87	92	95	102	94	100
			0.1	500	201	171	175	181	182	77.4
			0.5	500	128	96	103	103	107.5	45.7
			0.75	1000	40	33	42	37	38	8.0
			1.0	2000	21	29	21	37	27	2.8

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Act D-Konz. (µg/ml)	Einsaat	Kolonieausbeute 4h Act D Exposition				Mittelwert X	Überlebensrate (%)
HAK 40	16.1.80	76	-	200	163	136	157	152	152	100
			0.1	500	366	334	350	346	349	91.8
			0.25	500	192	229	217	234	218	57.3
			0.5	500	29	37	51	31	37	9.7
			0.75	1000	16	22	12	12	15.5	2.0
HAK 43	6.2.80	42.5	-	200	99	80	90	71	85	100
			0.1	500	186	188	227	199	200	94.1
			0.25	500	80	82	94	88	86	40.5
			0.5	1000	41	75	53	47	54	12.7
			0.75	2000	28	24	31	23	26.5	3.1
HAK 49	11.3.80	47	-	200	87	92	95	102	94	100
			0.1	500	139	170	155	134	149.5	63.6
			0.25	1000	186	152	228	186	188	40.0
			0.5	1000	74	73	79	90	79	16.8
			0.75	2000	13	21	17	25	19	2.0

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Act D-Konz. (µg/ml)	Einsaat	Kolonieausbeute			Mittelwert X	Überlebensrate (%)
					8h Act D Exposition				
HAK 47	5.3.80	56	-	200	110	118	101	112	100
					118	87	126		
			0.1	500	163	148	163	168	60.0
					188	178	170		
			0.2	1000	162	205	137	173	30.8
					180	170	186		
			0.3	2000	234	181	158	193	17.2
					196	208	183		
			0.4	3000	128	101	109	120.5	7.1
					132	129	125		
			0.5	4000	81	62	63	71	3.1
					74	77	69		
					24h Act D Exposition				
HAK 47	5.3.80	56	-	200	110	118	101	112	100
					118	97	126		
			0.05	1000	307	320	310	320	57.1
					308	332	341		

Zell-passage Nr.	Datum	PE(%)	Act D-Konz. (µg/ml)	Einsaat	Kolonieausbeute 24h Act D Exposition			Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)
HAK 47	5.3.80	56	0.1	2000	127	154	112	124	11.0
					131	91	129		
			0.15	4000	140	139	173	154	6.8
					146	178	152		
			0.20	5000	67	127	134	101	3.6
					113	70	94		
			0.25	5000	63	49	40	54	1.9
					43	63	68		

Berechnung der Überlebensrate behandelter Zellen:

$$\left(\frac{X}{\text{Einsaat}} : \frac{x \text{ der unbehandelten Kontrollen}}{\text{Einsaat der Kontrollen}} \right) \times 100$$

Tabelle IV: Daten der Regressionsgeraden

Konzentration (µg/ml)	Schnittpkt. mit der y-Achse (%)	Korrelations Koeffizient	y-Wert für 2h	4h	8h	24h	Steigung der Geraden
0.1	104.53	0.95	87.34	73.9	50.96	12.1	-0.09
0.25	94.97	0.99	68.32	49.14	25.3	1.82	-0.16
0.5	97.5	0.97	38.82	15.46	2.45		-0.46
0.75	82.32	0.95	12.52	1.91			-0.94

Tabelle V: Aufführung der Einzelversuchsergebnisse zur Bestimmung der Interaktion von Act D und Bestrahlung

Zellpassage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlendosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittelwert X	Überlebensrate (%)	Überlebensrate bez. auf 100% Act D Kontrolle
HAK 52	46	-	-	200	94	92	100	82	92	100	
31.3.80		0.5	-	500	54	34	14	6	27	11.7	
		1.0	-	3000	12	21	9	31	18	1.3	
			3	200	58	72	78	71	70	75.8	
			5	500	154	177	157	152	160	69.5	
			10	1000	119	127	113	116	119	25.8	
			15	3000	49	65	64	51	57	4.1	
8h		0.5	5	3000	21	39	45		35	2.53	21.6
			10	5000	18	24	41		27	1.17	10.0
			15	10000	14	17	11		14	0.30	2.5
		1.0	3	5000	7	12	9		9	0.39	30.0
			6	10000	13	14	9		12	0.26	20.0
			9	20000	15	21	11	20	17	0.18	13.8

Zellpassage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlendosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittelwert X	Überlebensrate (%)	Überlebensrate bez. auf 100% Act D Kontrolle
HAK 55											
24.4.80	65	-	-	200	129	122	127	142	130	100	
		0.5	-	500	78	89	79	82	82	25.2	
		1.0	-	3000	58	61	63	49	58	2.9	
			5	500	254	281	224	242	250	76.9	
			8	1000	362	379	357	348	361.5	55.6	
			12	3000	241	225	227	271	241	12.3	
			15	3000	68	64	51	82	66	3.4	
			17	5000	47	25	39	53	41	1.3	
8h		0.5	2	1000	78	54	66		66	10.1	40.0
			5	3000	63	67	92		74	3.8	15.0
			8	5000	48	19	43	38	37	1.1	4.3
			12	10000	18	44	37	45	36	0.55	2.1
		1.0	3	5000	15	28	21		21	0.64	22.0
			6	10000	23	25	21	31	25	0.38	13.1
			9	20000	57	22	24	35	34.5	0.26	8.9

Zell-passage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)	Überlebens-rate bez. auf 100% Act D Kon-trolle
HAK 77											
18.9.80	73.5	-	-	200	154	150	147	137	147	100	
		0.5	-	1000	293	256	249		266	36.1	
		1.0	-	5000	363	468	377		402	10.9	
			5	500	235	218	236	231	230	62.5	
			10	1000	211	207	241	209	217	29.5	
1h		0.5	5	10000	371	219	310		300	4.0	11.0
			10	20000	71	87	82		80	6.54	1.5
		1.0	5	20000	29	47	49		41.6	0.27	2.4
			10	30000	27	35	36		32.6	0.14	1.2
2h		0.5	5	5000	383	162	258		207.6	7.26	20.1
			10	10000	34	46	42		40.6	0.55	1.5
		1.0	5	10000	43	79	58		60.0	0.81	7.4
			10	30000	31	33	28		30.6	0.13	1.2

Zell-passage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)	Überlebens-rate bez. auf 100% Act D Kontrolle
4h		0.5	5	5000	97	112	85		98	2.66	7.3
			10	10000	31	42	43		38.6	0.52	1.4
		1.0	5	10000	37	24	42		34.3	0.46	4.2
			10	30000	17	38	26		27	0.12	1.1
6h		0.5	5	3000	143	89	112		114.6	5.20	14.4
			10	5000	14	21	36		236	0.64	1.7
		1.0	5	10000	66	48	73		62.3	0.84	7.7
			10	30000	49	37	40		42	0.19	1.7
24h		0.5	5	30000	121	78	107		102	4.62	12.8
			10	5000	42	21	39		34	0.92	2.5
		1.0	5	10000	79	141	103		107.6	1.46	13.4
			10	20000	46	23	32		33.6	0.22	2.0
HAK 81	63	-	-	200	132	114	130	128	126	100	
16.10.80		0.5	-	1000	45	43	50	54	48	7.6	
		1.0	-	4000	47	62	45	39	48	1.9	
			5	500	199	198	218	207	205.5	65.5	
			10	1000	158	141	130	123	138	22.0	

Zell-passage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-wert X	Überlebens-rate (%)	Überlebens-rate bez. auf 100% Act D Kontrolle
1h		0.5	5	5000	12	10	24	70	29	0.92	12.1
			10	10000	21	18	12	17	17	0.26	3.4
		1.0	5	20000	34	27	20	19	25	0.19	10.0
			10	30000	16	12	25	9	15.5	0.08	4.2
2h		0.5	5	4000	16	30	22	24	23	0.91	11.9
			10	10000	13	9	21	15	14.5	0.23	3.0
		1.0	5	10000	7	13	16	12	12	0.19	10.0
			10	30000	17	2	12	5	9	0.04	2.1
4h		0.5	5	5000	22	28	33	35	29.5	0.93	12.2
			10	10000	23	26	20	11	20	0.31	4.0
		1.0	5	10000	19	15	8	10	13	0.20	10.5
			10	30000	18	8	15	13	13.5	0.07	3.6
HAK 82	79	-	-	200	147	155	168	162	158	100	
23.10.80		0.5	-	1000	133	215	127	121	149	18.8	
		1.0	-	4000	46	52	39	61	49.5	1.5	
			5	500	291	239	275	295	275	69.6	
			10	1000	214	191	196	231	208	26.3	

Zell-passage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-wert X	Über-lebens-rate (%)	Überlebens-rate bez. auf 100% Act D Kontrolle
6h		0.5	5	3000	52	60	51	49	53	2.23	11.8
			10	10000	31	14	24	61	32.5	0.41	2.1
		1.0	5	10000	7	4	5	16	8	0.10	6.6
			10	30000	12	5	8	7	8	0.03	2.0
8h		0.5	5	3000	67	81	154		104	4.38	23.3
			10	5000	22	22	18	38	25	0.63	3.3
		1.0	5	10000	12	19	24	29	21	0.26	17.3
			10	20000	7	14	9	16	11.5	0.07	4.6
24h		0.5	5	3000	76	64	89	69	74.5	3.14	16.7
			10	5000	13	27	12	19	17.75	0.44	2.3
		1.0	5	10000	10	9	28	17	16	0.20	13.3
			10	20000	10	12	16	8	11.5	0.07	4.6
HAK 85	59	-	-	200	136	114	109	113	118	100	
27.11.80		0.5		1000	95	62	88	89	83.5	14.1	
		1.0	-	5000	42	36	53	39	42.5	1.4	
			5	500	187	198	182	189	189	64.0	
			10	1000	126	158	153	163	150	25.4	

Zell-passage-Nr. Datum Intervall	PE(%)	Act D Konz. (µg/ml)	Strahlen-dosis (Gy)	Einsaat	Kolonieausbeute				Mittel-wert X	Über-lebens-rate (%)	Überlebens-rate bez. auf 100 % Act D Kontrolle
1h		0.5	5	10000	98	79	83	86	86.5	1.46	10.3
			10	20000	44	57	63	42	51.5	0.43	3.0
		1.0	5	20000	11	21	9	17	14.5	0.12	8.5
			10	30000	9	11	13	7	10	0.05	3.5
2h		0.5	5	5000	81	42	110	71	76	2.57	18.2
			10	10000	28	16	30	24	24.5	0.41	2.9
		1.0	5	10000	13	14	10	11	12	0.20	14.2
			10	30000	12	11	4	7	8.5	0.04	2.8
4h		0.5	5	5000	24	79	47	38	47	1.59	11.2
			10	10000	22	21	18	25	21.5	0.40	2.8
		1.0	5	10000	5	9	14	6	8.5	0.14	10.0
			10	30000	5	3	7	11	6.5	0.03	2.1

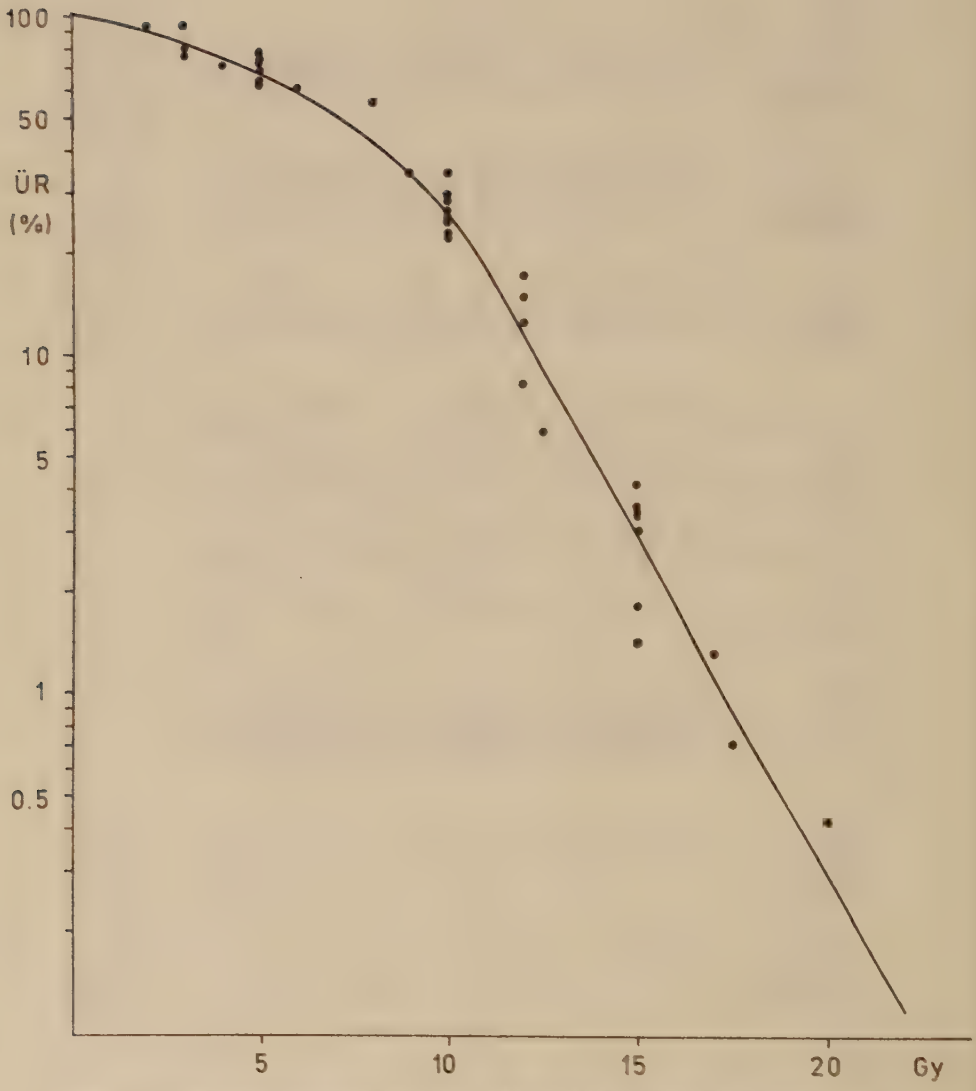


Abb. 1: Dosiswirkungskurve bei HAK-Zellen nach einmaliger Bestrahlung mit Gammastrahlen. Darstellung der Überlebensrate jedes Einzelversuches laut Tabelle II.

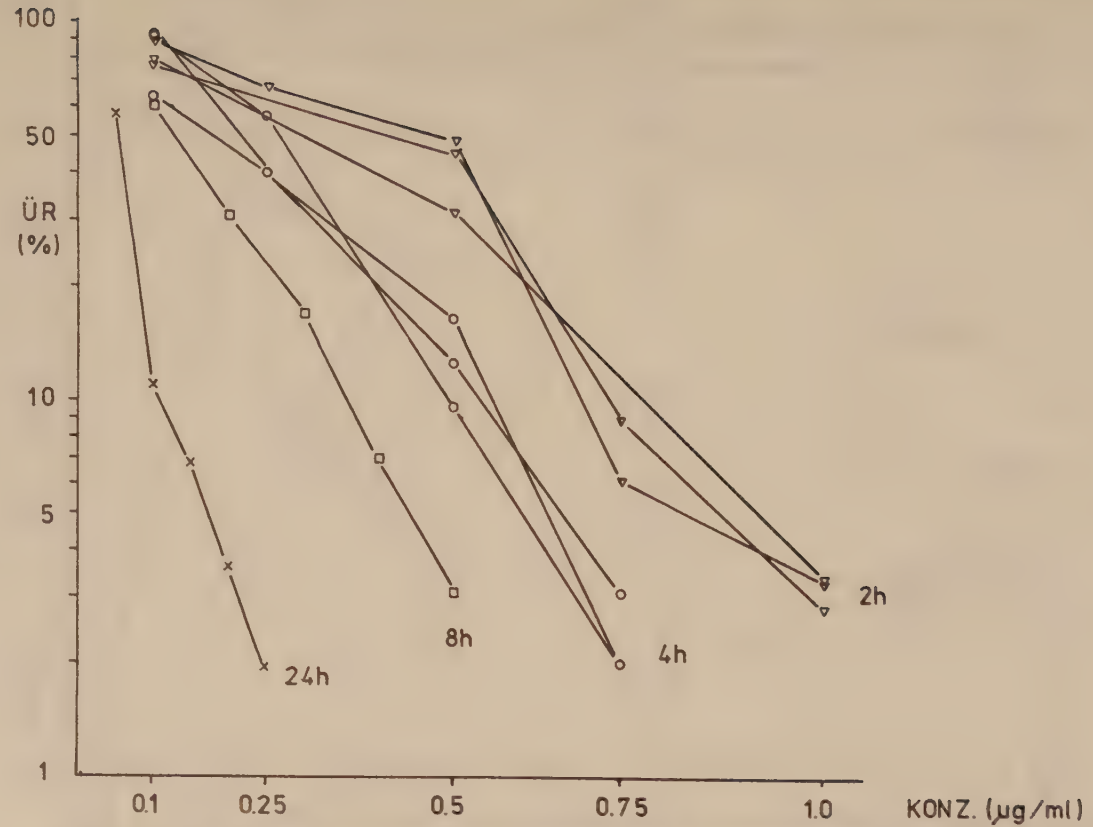


Abb. 2: Beziehung zwischen Überlebensrate und Konzentration bei konstanten Expositionszeiten.
Darstellung der Einzelversuche nach Tabelle III.

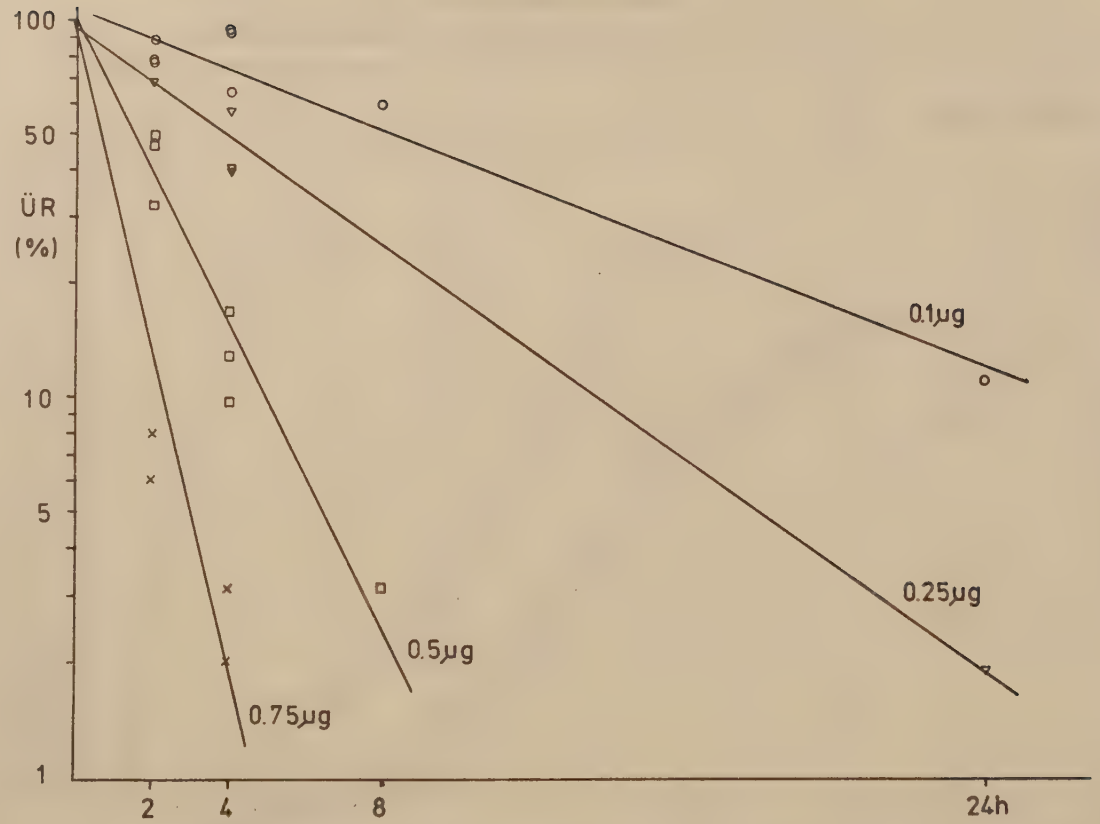


Abb. 3: Beziehung zwischen Überlebensrate und Einwirkdauer bei konstanten Act D-Konzentrationen. Darstellung der Regressions-Geraden laut Tabelle IV.

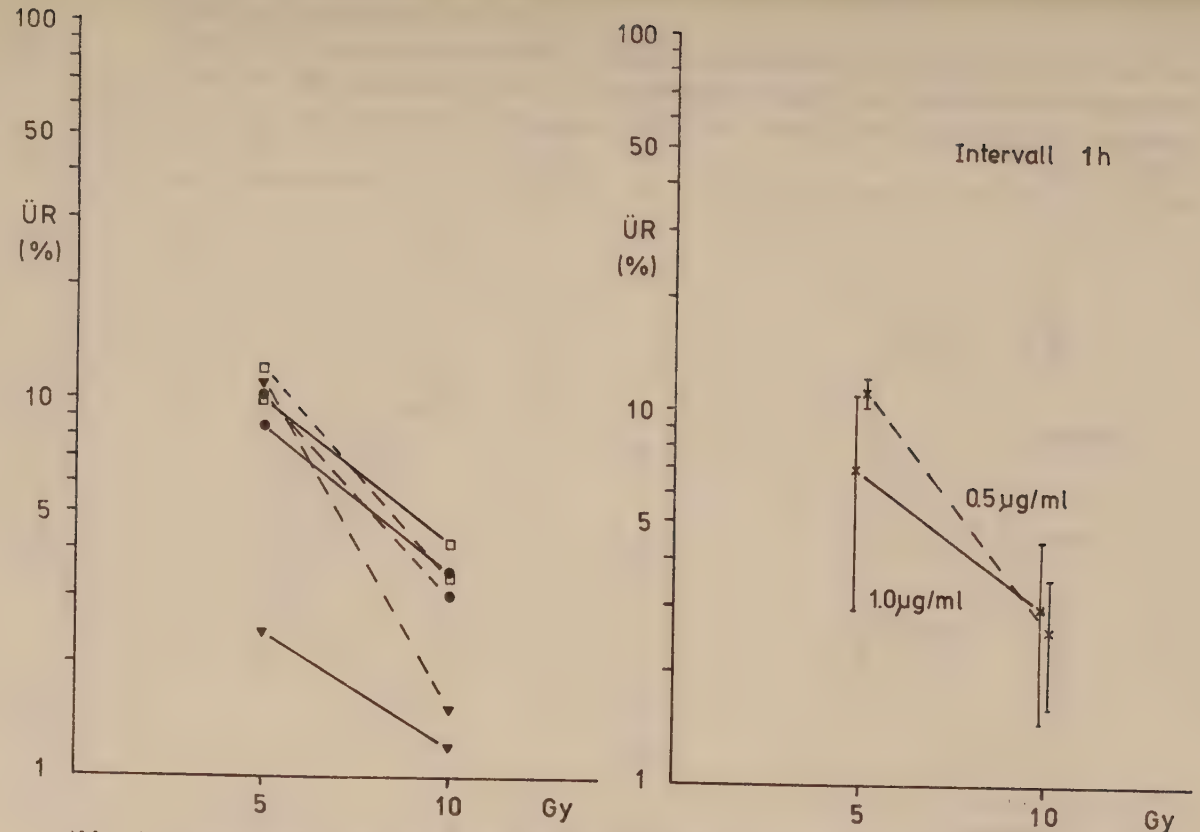


Abb. 4: Interaktion von Act D und Bestrahlung bei einem behandlungsfreien Intervall von 1h. Das linke Bild zeigt die Einzelversuche, das rechte die gemittelten Werte mit Standardabweichung. Symbole siehe unter 3.5. 100% ÜR normiert auf die Überlebensrate nach Act D.

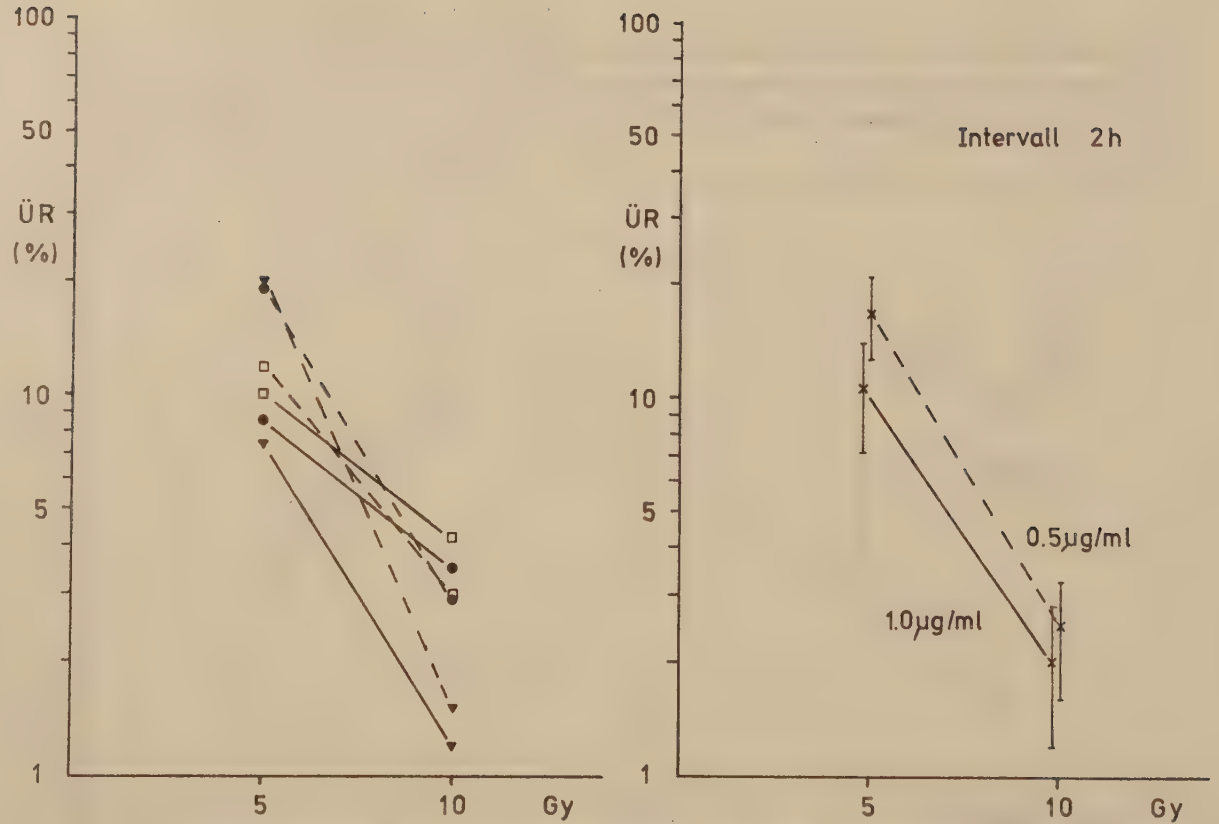


Abb. 5: Interaktion von Act D und Bestrahlung bei einem behandlungsfreien Intervall von 2h. Das linke Bild zeigt die Einzelversuche, das rechte die gemittelten Werte mit Standardabweichung. Symbole siehe unter 3.5. 100% ÜR normiert auf die Überlebensrate nach Act D.

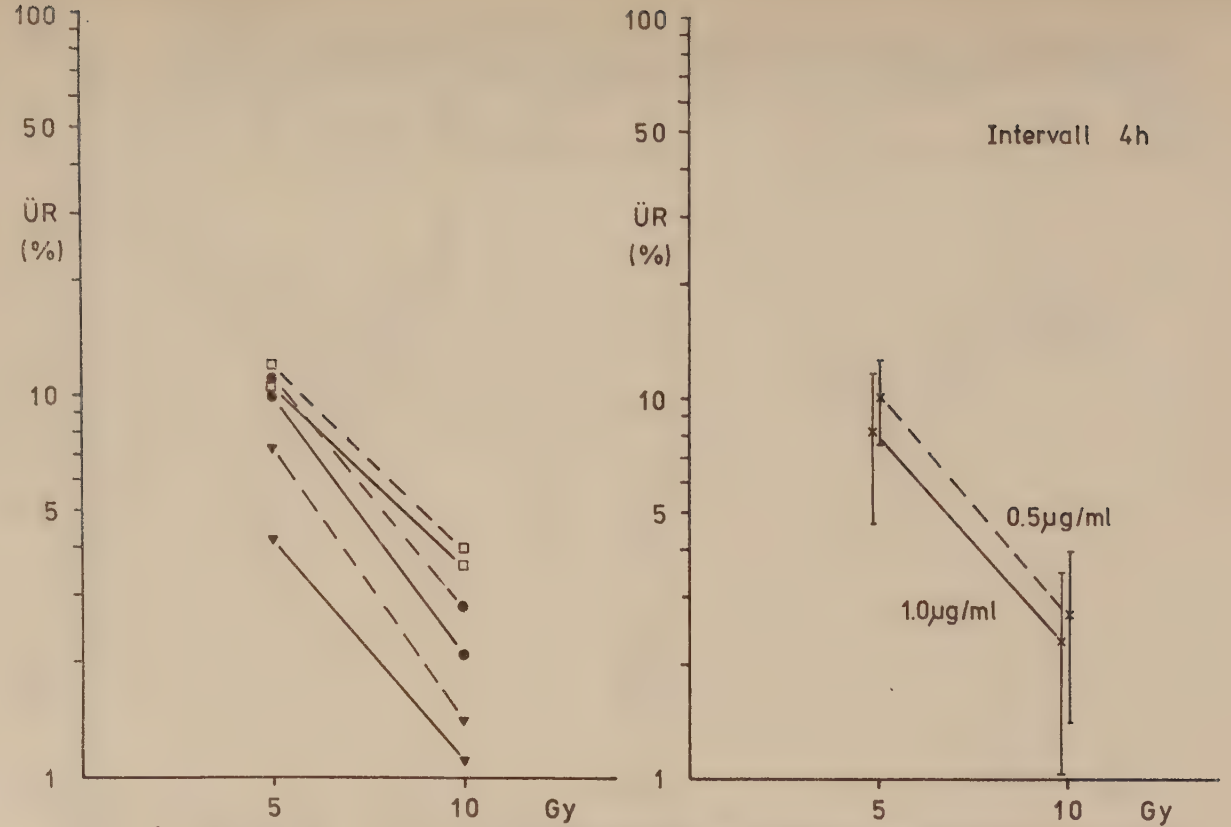


Abb. 6: Interaktion von Act D und Bestrahlung bei einem behandlungsfreien Intervall von 4h. Das linke Bild zeigt die Einzelversuche, das rechte die gemittelten Werte mit Standardabweichung. Symbole siehe unter 3.5. 100% ÜR normiert auf die Überlebensrate nach Act D.

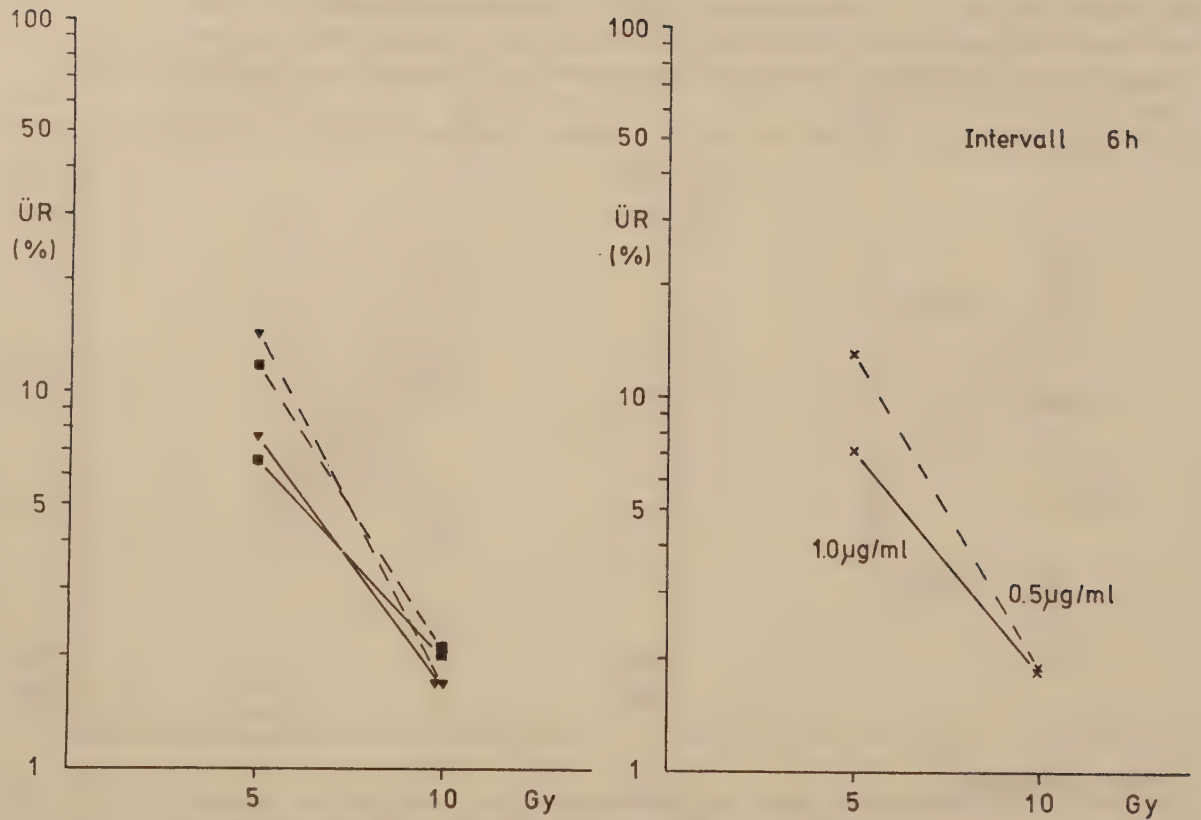


Abb. 7: Interaktion von Act D und Bestrahlung bei einem behandlungsfreien Intervall von 6h. Darstellung wie in Abb. 1. 100% ÜR normiert auf die Überlebensrate nach Act D.

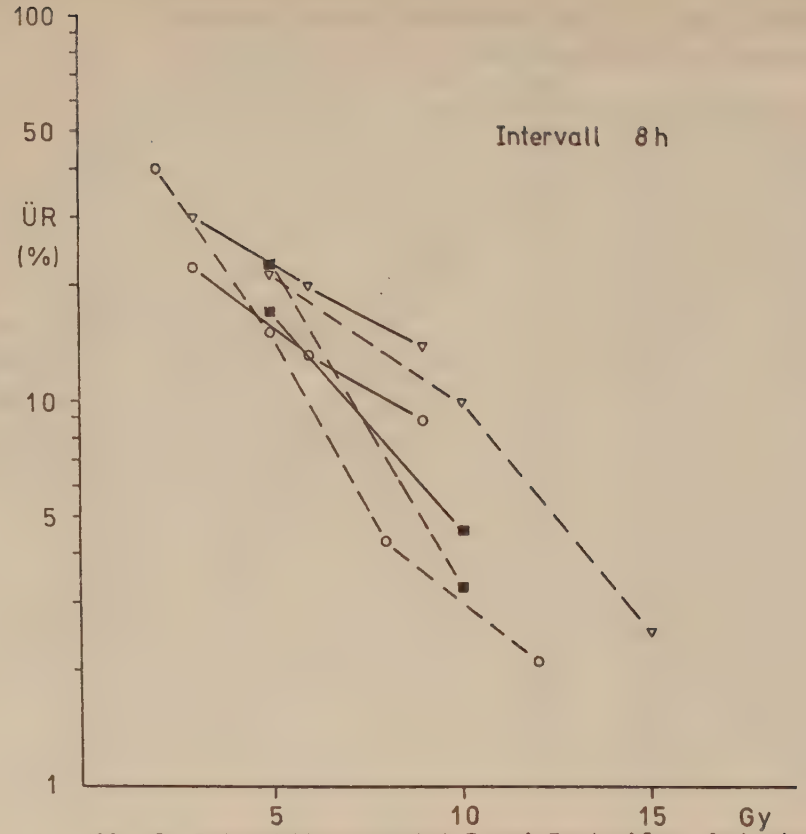


Abb. 8: Interaktion von Act D und Bestrahlung bei einem behandlungsfreien Intervall von 8h. Darstellung der Einzelversuche. Symbole siehe unter 3.5. 100% ÜR normiert auf die Überlebensrate nach Act D.

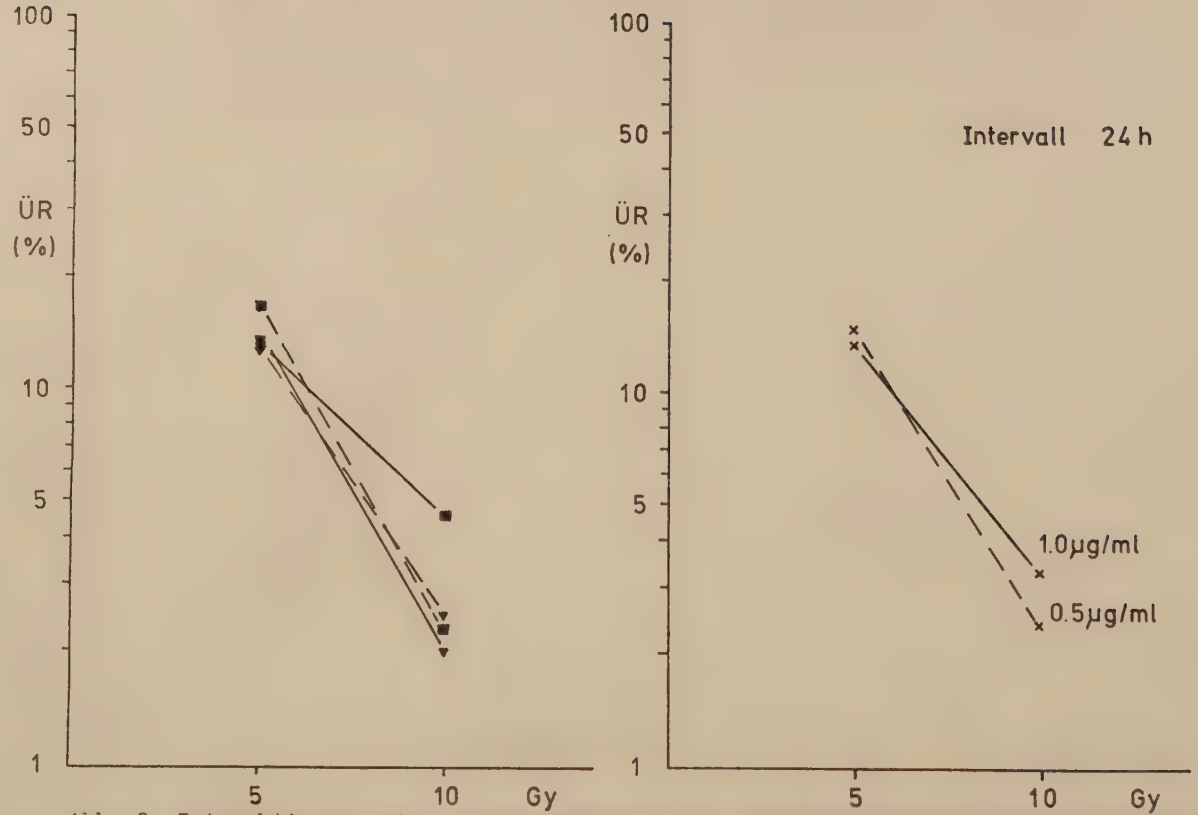


Abb. 9: Interaktion von Act D und Bestrahlung bei einem behandlungsfreien Intervall von 24h. Darstellung wie in Abb. 1. 100% ÜR normiert auf die Überlebensrate nach Act D.

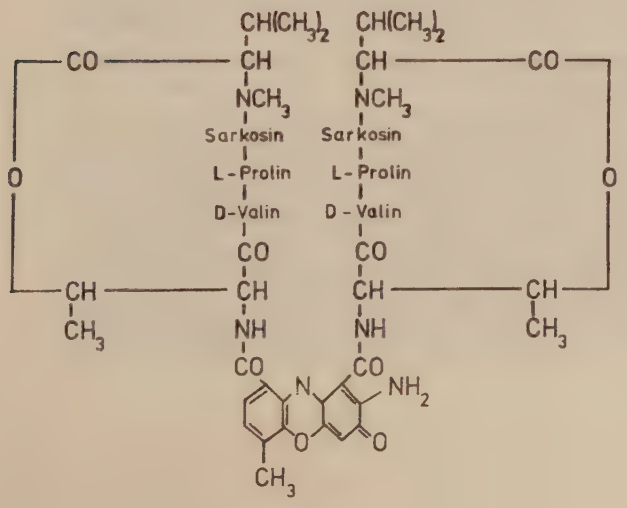
4. Diskussion

4.1. Actinomycin D und seine Wirkungen

4.1.1. Struktur von Act D

Act D, zuerst isoliert und beschrieben von Waksman und Vining 1954, gehört zu den Actinomycinen, einer Gruppe von Antibiotika, die aus verschiedenen Streptomycesarten gewonnen werden. Es besteht aus einem ebenen Phenoxazonring (eine Farbstoffgruppe), der säureamidartig an die terminalen Aminogruppen je eines Pentapepids gebunden ist. Die identischen Pentapeptide sind jeweils aus L-Threonin, D-Valin, L-Prolin, Sarkosin und N-Methylvalin zusammengesetzt. L-Threonin und N-Methylvalin sind durch einen makrozyklischen Lactonring verbunden. Actinomycine sind im wesentlichen gleichartig aufgebaut und unterscheiden sich nur in den Aminosäurezusammensetzungen der Peptidketten.

Nachfolgende Abbildung zeigt die Struktur von Act D:



4.1.2. Biochemische Wirkungsweise

Act D ist ein außerordentlich wirksamer Inhibitor der Proteinsynthese, indem es stabile Komplexe mit der DNA bildet und dabei die DNA-abhängige RNA-Polymerase von ihrer Bindungsstelle zur Transcription verdrängt. (Kirk 1960; Goldberg und Rabinowitz 1962). Eingehende Untersuchungen an zellfreien Systemen haben weiterhin ergeben, daß sich Act D bevorzugt zwischen die beiden Basenpaare Guanin und Cytosin der DNA-Helix ein- oder anlagert, nicht jedoch zwischen Adenin und Thymin (Hurwitz 1962; Reich und Goldberg 1964; Goldberg 1965; Cerami et al. 1967). Wurden nämlich DNA-Präparate verwendet, die nur Desoxythymidylsäure oder Desoxyadenylsäure und Desoxythymidylsäure enthielten, so war keine Beeinträchtigung deren Cofaktorwirkung bei Zugabe von Act D festzustellen. Von entscheidender Bedeutung ist das Guanin, welches für die Bildung eines Desoxyguanosin- Act D -Komplexes verantwortlich ist. Im Zentrum des Komplexes liegt der Phenoxaring, wobei sich eine Peptidschleife oberhalb und die andere unterhalb des Ringes befindet. Die Bindung im Komplex zwischen DNA und Act D wird durch Wasserstoffbrücken bewirkt, da er, nach Gelfiltration an Sephadex isoliert, erst bei der Dialyse gegen Harnstofflösungen zerfällt. (Hartmann et al. 1962)
Eine Ablesung der DNA, die nach dem Prinzip der Basenpaarung erfolgt, wird somit blockiert. Offensichtlich reagiert dabei die DNA-abhängige RNA--Polymerase viel empfindlicher auf Act D-Gaben als die DNA-Polymerase, denn bei geringen Konzentrationen von Act D wird selektiv nur die RNA--Synthese gehemmt, während die DNA-Synthese erst

bei viel höheren Konzentrationen beeinträchtigt wird. (Reich et al. 1961; Hurwitz 1962) Darüberhinaus scheinen noch andere Faktoren bei der Wirkung des Actinomycins eine Rolle zu spielen. Führt man exakt proportional zum Gehalt an Guanin einer DNA, besonders bei den DNA's mit mittlerem bis hohem Guaninanteil, Act D zu, so ergibt sich eine geringere Bindung von Act D - -Molekülen an die DNA als erwartet. Gellert et al 1965 und Gursky 1969 erklärten dies mit einer sterischen Veränderung der DNA durch das gebundene Antibiotikum oder einer lokalen Verdrehung der DNA an der Bindungsstelle, die eine Bindung eines benachbarten Act D-Moleküls verhindert.

4.1.3. Klinische Anwendung von Act D

Die außerordentlichen zytotoxischen Wirkungen von Act D verbieten seinen Einsatz als Antibiotikum zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Es wird deshalb bevorzugt zur Behandlung maligner Tumoren eingesetzt, entweder allein oder in Kombination mit Strahlentherapie oder Chirurgie. Am besten sprechen Wilmstumor, Rhabdomyosarkom, Neoplasmen des Hodens und des Uterus auf eine Therapie mit Act D an.
Der Wilmstumor, ein embryonales Adenosarkom der Niere mit schneller Metastasenausbreitung in den Lungen und den regionalen Lymphknoten ist die Hauptindikation zur Behandlung mit Act D. Rund 30% der Patienten zeigen befriedigende Ergebnisse (Farber 1960). Wird jedoch die Anwendung von Act D durch eine zusätzliche Bestrahlung in jeweils niedrigerer Dosierung unterstützt, so sind beeindruckende Ergebnisse zu beobachten.

Farber 1960 beschrieb die ersten Ergebnisse bei chirurgischer, radiologischer und kurzzeitiger Act D-Kombinations-Behandlung bei 53 Kindern mit Wilmstumor, wo zum Zeitpunkt der Aufnahme noch keine Metastasen nachgewiesen werden konnten. 35 Kinder (66%) waren nach 2 Jahren geheilt. Bei 10 (63%) von 16 Kindern, die nach der ersten Monotherapie mit Act D Lungenmetastasen entwickelten, konnten innerhalb von zwei Jahren nach einer zusätzlich kombinierten Strahlen- und Act D-Therapie keine Anzeichen einer Erkrankung festgestellt werden. Allerdings wurden auch Fälle beobachtet, wo eine Remission nur wenige Wochen anhielt und eine weitere Behandlung mit Act D bei weitem nicht mehr so gut ansprach.
Bei der Behandlung des Rhabdomyosarkoms, ein relativ strahlenresistentes Weichteilsarkom, werden nicht so gute Erfolge erzielt wie beim Wilmstumor. Jedoch läßt sich unter Kombination von Strahlen- und Chemotherapie eine Größenabnahme des Tumors erreichen, die dadurch erst ein chirurgisches Vorgehen ermöglicht. Bei generalisierten Tumoren wird dazu eine Kombinations-Chemotherapie, bestehend aus Vincristin, Act D und Cyclophosphamid, über 1 Jahr ausgedehnt, wobei die wöchentliche Dreifach-Kombination alle 2 Monate wiederholt wird. Ist der Tumor lokalisierbar, wird zusätzlich mit 40 - 60 Gy bestrahlt, bzw. reseziert.
(Lampert 1977)
Ravdin (1960) beobachtete eine teilweise bis vollständige Rückbildung von Lungenmetastasen bei Carcinomen des Hodens oder des Uterus (embryonale Tumoren, maligne Teratome, Seminome,

Chorionepitheliome) wie auch bei Rhabdomyosarkomen nach Behandlung mit Act D in Verbindung mit einem alkylierenden Chemotherapeutikum oder einem Antimetaboliten.

4.1.4. Nebenwirkungen von Act D

Die toxischen Reaktionen, hervorgerufen durch Act D, sind in der Regel dosisabhängig. Die Symptome treten gewöhnlich erst 2 - 4 Tage nach Behandlungsende in Erscheinung und können bis zu 2 Wochen andauern. Rasch proliferierendes Gewebe wie Knochenmark und Darmepithel reagieren am empfindlichsten auf eine Act D-Behandlung.

Unabhängig von der Dosierung und schon wenige Stunden nach Behandlungsbeginn treten Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen auf. Die Knochenmarksdepression und damit eine schwere Beeinträchtigung des hämolytischen Systems kann sich durch eine Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie und Retikulozytopenie zeigen (Tan 1960). Anorexie, Bauchschmerzen, Diarrhoe und Magen--Darm-Ulcera sind Ausdruck schwerer gastrointestinaler Wirkungen. Dermatologische Komplikationen sind meist Alopecie und charakteristische Exantheme, vor allem in Kombination mit Bestrahlungen. Die geschilderten toxischen Erscheinungen konnten in vergleichenden Studien an Hunden und Rhesusaffen durch Henry und Marlow (1973) weitgehend bestätigt werden.

4.1.5. Act D und Strahlentherapie

Klinische Erfahrungen in der Behandlung des Wilmstumor zeigen, daß eine Kombination von Act D und Strahlentherapie die besten Ergebnisse erzielt. Darüberhinaus weisen zahlreiche Anhaltspunkte darauf hin, daß Act D und Strahlentherapie sich wechselseitig in der Form beeinflussen, wonach Act D die Wirksamkeit einer Strahlentherapie und damit auch deren Nebenwirkungen verstärkt, bzw. bei gleichzeitiger Bestrahlung stärker zytotoxisch wirkt. Phillips 1980 beschreibt in einer Übersicht verschiedener Untersuchungsergebnisse die Wechselwirkung einer Kombination von Strahlentherapie und Chemotherapie auf gesundes, menschliches Gewebe.
Erste Anzeichen einer Wechselwirkung von Strahlenschaden und Chemotherapie gaben Hautreaktionen und die Entwicklung einer Strahlenpneumonitis bei Kindern mit Wilmstumor unter der kombinierten Behandlung von Act D und Bestrahlung. Danach kann ein Erythem als Nebenerscheinung einer zunächst durchgeführten Strahlenbehandlung durch die Anwendung von Act D in dem bestrahlten Bereich reaktiviert werden, vor allem bei einem kurzen Intervall zwischen den beiden Behandlungsmethoden, aber auch noch nach mehreren Monaten. Bei gleichzeitiger Verabreichung von Act D und Bestrahlung tritt bereits nach einer unter der Norm liegenden Strahlendosis ein Erythem auf der normalen Haut sowie auf der Mund- und Rachenschleimhaut auf.

Nach Bestrahlung der gesamten Lunge bei metastasiertem Wilmstumor mit tolerierten Strahlendosen und einer zwei Monate später erfolgten Act D-Gabe, konnte die Entwicklung einer tödlichen Strahlenpneumonitis beobachtet werden, wobei das behandlungsfreie Intervall beschwerdefrei geblieben war. Histologische Untersuchungen zeigten die typischen Makrophageninfiltrationen und Degenerationen der Alveolarsepten einer Strahlenpneumonitis. Die Act D-Behandlung ist offensichtlich dafür verantwortlich, daß der subklinisch latente Strahlenschaden in einen klinisch bedrohlichen Zustand übergeht. Aufgrund dieser potenzierenden Wirkung von Act D müssen daher nach Empfehlung von Phillips bei einer Bestrahlung der Lunge, in Verbindung mit vorgezogenen, gleichzeitigen oder anschließenden Behandlungen mit Act D, die zu verabreichenden Strahlendosen um 30 bis 40% reduziert werden, um die beschriebenen Veränderungen des Lungengewebes zu verhindern.
Auch bei einer Strahlentherapie der Nieren, vornehmlich bei Kindern mit Wilmstumor, konnten verstärkte Nebenwirkungen bei begleitenden Act D--Behandlungen festgestellt werden, obwohl nur Strahlendosen zwischen 15 Gy und 20 Gy verabreicht wurden, die allgemein als unbedenklich eingestuft werden. Besonders bei halbseitiger Bestrahlung des rechten Abdomens zur Therapie des Wilmstumors muß nicht nur mit Auswirkungen auf die Niere, sondern auch mit erhöhten Strahlenschäden der Leber gerechnet werden. Dabei sind vor allem die Endothelzellen der sinusoidalen Leberkapillaren von der Zerstörung bei einer vor-

angehenden oder gleichzeitigen Act D bzw. Act D-Vincristin Kombinationstherapie betroffen. Gesteigerte Strahlenschädigungen der Leber müssen neben der Therapie des Wilmstumor auch bei Behandlungen von Carcinommetastasen des Colon oder Ovarialcarcinomen in Betracht gezogen werden. In einigen Fällen konnten auch verstärkt Schleimhautveränderungen bei Bestrahlung der Blase, sowie das Auftreten von Katarakten und Keratitiden des Auges nach Bestrahlung der Orbita unter Anwendung einer Act D-Therapie, bzw. einer Polychemotherapie festgestellt werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Strahlendosiseffektkurve

In Abb. 1 ist die Dosiswirkungskurve für die Inaktivierung von HAK-Zellen in vitro nach einmaliger Bestrahlung mit Gammastrahlen dargestellt. Es zeigt sich im halblog. Maßstab eine sogenannte Schulterkurve, wie sie erstmals von Puck und Mitarb. (1956) für Säugetierzellarten nach einer von ihm entwickelten Methode zur Zellkultivierung veröffentlicht wurde. Die Kurve läßt sich in zwei Bereiche aufteilen:
einmal in den Bereich der Schulter bei niedriger Strahlendosis, wo Bestrahlung eine geringe Wirkung hinterläßt und zum zweiten in einen exponentiellen Teil, wo der Logarithmus der Überlebensrate eine lineare Funktion der Strahlendosis darstellt, mit anderen Worten, die Reaktivität nimmt mit steigender Dosis zu, um schließlich einen konstanten Wert zu erreichen.
Als hinreichende Definition einer derartigen Dosiseffektkurve gelten nach Alper et al. (1960)

2 Bestimmungsgrößen, die D_0 und die Extrapolationsnummer n. D_0 wird als diejenige Dosis bezeichnet, die im geradlinigen, exponentiellen Teil der Kurve die Zahl der jeweils noch überlebenden Zellen um den Faktor 1/e vermindert. Die Extrapolationsnummer ergibt sich, wenn man den geradlinigen Teil der Kurve verlängert, aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate. Aus der Dosiseffektkurve für HAK-Zellen ergeben sich als Parameter D_0= 230 rad und die Extrapolationsnummer n=21. Mathematisch läßt sich eine so geartete Dosiseffektkurve folgendermaßen darstellen:

$$\text{Überlebensrate (ÜR)} = 1 - (1-e^{-KD})^n$$

ÜR stellt die Überlebensrate in % dar, e die Basis des natürlichen Logarithmus, K die Steigung des geradlinig verlaufenden Teils der Kurve, D die Strahlendosis in rad und n die Extrapolationsnummer. Nach Berechnung ergibt sich unter Einbeziehung aller experimentellen Werte folgende Gleichung:

$$\text{ÜR} = 1 - (1-e^{-0.44 \times D})^{21}$$

Aus dem Verlauf derartiger Dosiseffektkurven, insbesondere aus dem Vorhandensein der Schulter, haben Elkind und Mitarb. nach Versuchen an chin. Hamsterzellen geschlossen, daß ein subletaler zellulärer Strahlenschaden existieren muß, der sich bis zu einem Schwellenwert, besonders bei niedrigen Strahlendosen, anhäuft. Bei Betrachtung der Kurve läßt sich daher Folgendes ableiten: mit zunehmender Strahlendosis wächst der Schaden pro Zelle an. Mit Höhe der

Strahlendosis nimmt die Steigung der Kurve zu und mit Übergang in den exponentiellen, geradlinigen Teil ist die Wirkung bei zunehmender Dosis am größten und bleibt konstant, d. h. der subletale Strahlenschaden hat sein Maximum erreicht. Überlebende Zellen aus dem exponentiellen Bereich der Kurve sind in der Lage, den subletalen Strahlenschaden zu reparieren. Dieser Prozeß beginnt unmittelbar nach Bestrahlung und ist bereits nach verabreichter Bestrahlung vor der ersten Zellteilung abgeschlossen. Den Nachweis hierfür erbrachte Elkind (1960)anhand von Fraktionierungsversuchen mit chin. Hamsterzellen. Bei HAK--Zellen zeigt sich bis zu einer Dosis von 10 Gy eine zunehmende Reaktivität, wobei erst 75% der Zellen bei dieser Strahlendosis inaktiviert sind. Beim Vergleich der D_0 und der Extrapolationsnummer n von HAK-Zellen mit Dosiseffektkurvenparametern anderer Gewebekulturen, ergibt sich, daß HAK-Zellen mit zu den resistentesten Zellarten gehören. Nach einer Zusammenstellung von Dosiseffektkurvenparametern von Whitemore und Till (1964) weisen zum Beispiel Zellen des chin. Hamsters Werte von D_0= 177 - 205 rad und n= 2,5 - 9,5 auf.

Auffallend sind dabei die unterschiedlichen Werte der verschiedenen Autoren. Als Ursache hierfür sind in erster Linie experimentell--technische Faktoren zu nennen. Änderungen der Temperatur, des pH und des Sauerstoffpartialdrucks können merkliche Einflüsse auf die Dosiseffektkurve nehmen, so daß auf jeden Fall Sorge getragen werden muß, diese Bedingungen

konstant zu halten. Unterschiede in der Dosis-effektkurve, z. B. bei verschiedenen Bestrahlungstemperaturen, können beträchtlich sein. Bei 5°C weisen Hela-Zellen eine rund 20% höhere D_0 auf als bei 37°C (Belli und Bonte 1963). Ähnliche Effekte wurden nachgewiesen bei L-Zellen (Whitemore u. Mitarb. 1969), chin. Hamsterzellen (Dewey und Miller 1970) und Mäuseleukämiezellen in vitro (Beer und Mitarb. 1963) nach einer Erniedrigung um wenige Grad, bei letzteren allerdings über längere Zeit hinweg.
Diese Effekte wurden bei allen Experimenten durch ständige Zufuhr von Sauerstoff während der Bestrahlung und sofortiges Rückführen der Flaschen in den Inkubator weitestgehend zu vermeiden gesucht. Trotzdem sind Veränderungen der obengenannten Faktoren nicht völlig auszuschließen, so daß neben zelleigener Unempfindlichkeit bzw. Kompensationsfähigkeit subletalen Strahlenschadens auch technische Einflüsse für die erhöhte Resistenz der Zellen verantwortlich sein können.

4.2.2. Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung

In den Versuchen wurde die Abhängigkeit der Überlebensrate von HAK-Zellen von der Konzentration, sowie von der Expositionsdauer von Act D untersucht. Wie in Abb. 2 und Abb. 3 veranschaulicht, nimmt die Überlebensrate bei konstanter Konzentration mit zunehmender Expositionsdauer und bei konstanter Expositionsdauer mit zunehmender Konzentration exponentiell ab.

Aus den Kurvenscharen ergibt sich, daß für Act D der Effekt im Bereich von Expositionszeiten zwischen 2h und 24h, sowie von Konzentrationen zwischen 0.1 - 1.0 µg/ml vom Produkt aus Expositionsdauer (t) und Konzentration (c) abhängig ist. Nach Skipper et al. (1970) läßt sich dieser Zusammenhang entsprechend der folgenden Gleichung darstellen:

$$\text{Überlebensrate (ÜR)} = e^{-t \cdot c \cdot \text{const.}}$$

Ebenfalls exponentiell abnehmende Überlebensraten wurden für chin. Hamsterzellen (Elkind 1969), Hela-Zellen (Djordjevic und Kim 1968); (Mauro u. Madoc-Jones 1970) sowie für Mäuse-L-Zellen (Bacchetti u. Whitemore 1967) nachgewiesen. Letztere fanden in ihren Untersuchungen mit asynchron wachsenden Zellen einen biphasischen exponentiellen Verlauf der Überlebensratenkurven, d. h., die Zellen zeigen sowohl bei konstanter Konzentration als auch nach konstanter Expositionszeit einen empfindlichen und einen mehr oder weniger widerstandsfähigen Teilverlauf. Ausmaß und Sensibilität der beiden Teilkurven waren unterschiedlich, je nachdem in welcher Wachstumsphase sich die Zellen befanden. Beim Übergang der Zellen von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase nahm der empfindliche Teil der Kurve ab und wurde resistenter, während der resistente Teil zugleich an Umfang und Resistenz zunahm. Sie begründeten dieses Verhalten mit einer verminderten Aufnahme von Act D in die Zelle und einer reduzierten DNA- und RNA-Synthese.

Nach Untersuchungen an synchronisierten Mäuse-L-Zellen, konnten Bacchetti und Whitemore (1967) als auch Mauro und Madoc-Jones an Hela-Zellen zeigen, daß eine enge Parallelität der Zyklusabhängigkeit von Act D mit der der Strahlenwirkung besteht. Danach ließ sich bei Mäuse-L-Zellen ein Maximum an Wirkung in der mittleren bis späten S-Phase feststellen, während die Zellen sowohl bei Act D-Exposition als auch bei Bestrahlung in G_1 und vor allem in G_2-Phase verhältnismäßig unempfindlich reagierten.
Elkind u. Mitarb. (1969) fanden an synchronisierten chin. Hamsterzellen eine maximale Wirkung von Act D in G_1 und in der frühen S-Phase. Zellen bei fortschreitender S-Phase entwickelten eine Schulterkurve und wurden mit zunehmender Sättigung subletalen Schadens durch Act D resistenter. In der späten S-Phase und G_2-Phase reagierten die Zellen mit maximaler Resistenz auf Act D-Gaben.

Wie bereits erwähnt, ergaben eingehende Untersuchungen, daß Act D sich mit der DNAeiner Zelle verbindet und die DNA-abhängige RNA-Polymerase hemmt, wodurch eine geordnete Proteinsynthese unmöglich ist. (Reich u. Goldberg 1964; Goldberg 1965). Die Unterbindung der Proteinsynthese und der daraus resultierende Zelltod ist dabei zum Teil vom Ausmaß der Komplexbindung zwischen Act D und der DNA abhängig. Wenn dies der Fall ist, kann man erwarten, daß Beeinträchtigungen der DNA, sich mit Act D zu verbinden, oder die Behinderung von Act D zur DNA zu gelangen, etwa bei Störungen in der Permeabilität der Zellmembran oder des Zellkerns, Änderungen der Sensibilität von Zellen zur Folge haben.

Elkind und Mitarb. gehen davon aus, daß die Zellzyklusspezifische Wirkung von Act D von der Fähigkeit des Zytostatikums abhängt, in den Zellkern einzudringen und eine Bindung mit der DNA einzugehen, sowie weiterhin abhängig ist vom speziellen Verhalten des DNA-Act D-Komplexes. Es ist naheliegend, die geschilderten Beobachtungen einer ausgeprägten Resistenz der Zelllinien in G_2-Phase, ganz im Gegensatz zur Strahlenwirkung, eben mit der begrenzten Aufnahmefähigkeit in den Zellkern in Verbindung zu bringen. Eine zusätzliche Erklärung, warum Zellzyklusphasen existieren, in denen Act D geringe Wirkungen entfaltet, besteht darin, daß Act D entweder an Stellen gebunden ist, die zu dieser Zeit gerade nicht aktiv sind, oder aber Mechanismen vorhanden sind, die es der Zelle erlauben, eine Bindung zwischen DNA und Act D zu lösen, bevor diese Stelle entweder für die DNA- oder RNA-Replikation aktiv wird. Letztere Annahme kann die Erklärung für die Beobachtung darstellen, daß der toxische Effekt von Act D nicht unmittelbar mit der intrazellulären Aufnahme korreliert. (Bacchetti u. Whitemore 1967).

4.2.3. Kombinationsversuche

4.2.3.1. Beschreibung der Ergebnisse

In Abb. 4 - 9 sind die Ergebnisse der Interaktion von Act D und Bestrahlung nach behandlungsfreien Intervallen von 1h - 24 h in halblog. Maßstab graphisch dargestellt. Wie bereits erwähnt, wurden die Experimente mit den Act D-Konzentrationen von 0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml durchgeführt, wobei

jeweils mit 5 Gy und 10 Gy bestrahlt wurde. Es zeigt sich, daß HAK-Zellen in dem beobachteten Strahlendosisbereich nach Vorbehandlung mit Act D äußerst sensibel reagieren. Mit zunehmender Strahlendosis nimmt die Überlebensrate rapide ab. Dabei ist die Vorbehandlung mit 1.0 µg/ml Act D-Konzentration bei gleichem behandlungsfreien Intervall mit einer stärkeren Abnahme der Überlebensrate verbunden, als bei Vorbehandlung mit 0.5 µg/ml Act D - Konzentration.

Einen sichtbaren Beweis der Interaktion zwischen Act D und Bestrahlung liefert Abb. 10. Hier wurden sämtliche Ergebniswerte einer Vorbehandlung mit 0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml Act D-Konzentration bei Bestrahlungsdosen von 5 Gy und 10 Gy in halblog. Maßstab eingetragen, einer Regressionsanalyse unterzogen, und der Strahlendosiswirkungskurve in direktem Vergleich gegenübergestellt. Eine Bestrahlung der HAK-Zellen 1 - 24h nach der Act D-Exposition führt danach zu einer ausgeprägten Sensibilisierung der Zellen, die sich in einem vollständigen Verlust der Schulter ohne signifikante Veränderung der D_0 äußert, d. h. es zeigt sich eine Verminderung der Überlebensrate nach einer exponentiellen Abhängigkeit. Die Regressionsgerade weist eine D_0 von 2.5 Gy auf, im Vergleich zur D_0 von 2.3 Gy der Strahlendosiseffektkurve bei einmaliger Bestrahlung und ohne Vorbehandlung. Die beobachteten Veränderungen sind unabhängig vom Intervall zwischen einer Act D-Vorbehandlung und einer Bestrahlung mit Gammastrahlen.

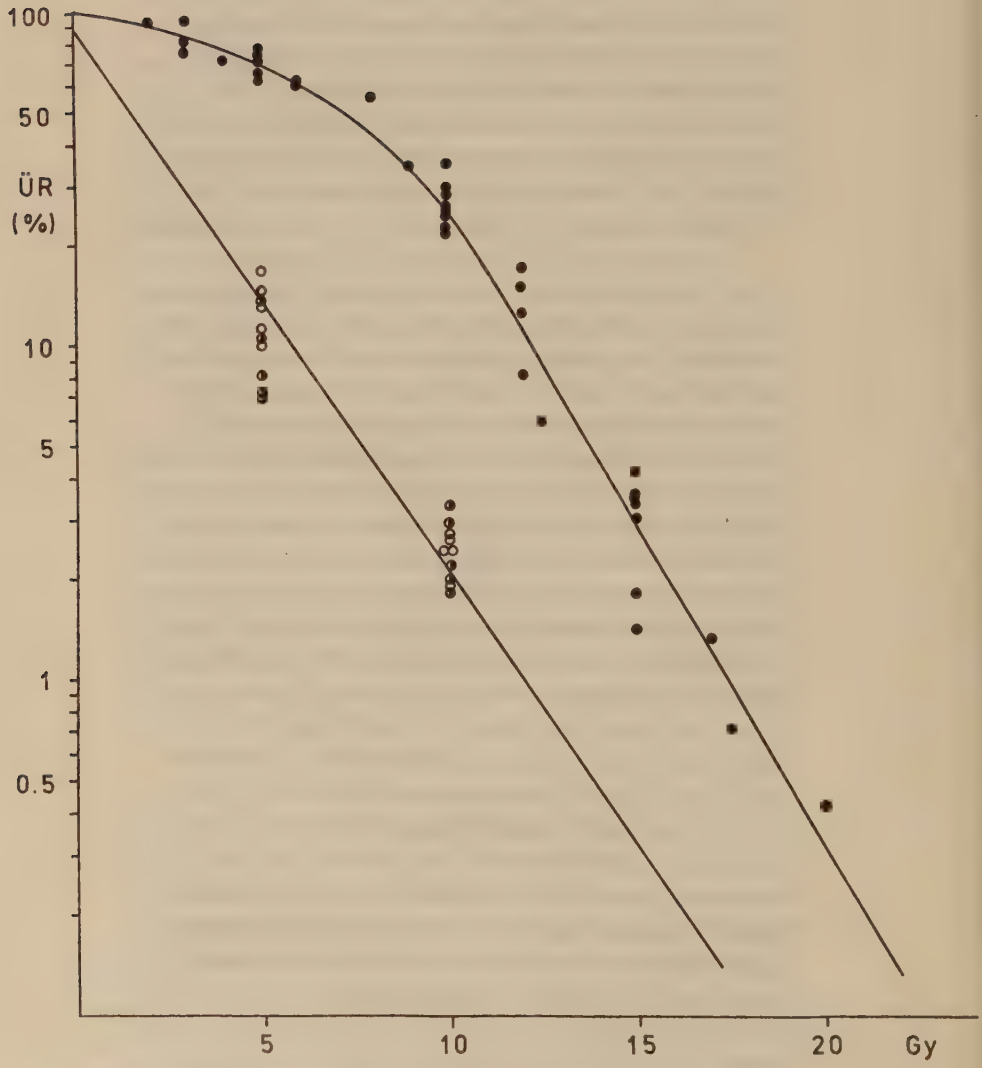


Abb. 10: Darstellung der Strahlendosiseffektkurve nach einmaliger Bestrahlung und nach zweistündiger Vorbehandlung mit Act D nach behandlungsfreien Intervallen von 1 - 24h. (-O- 0.5 µg/ml; -●- 1.0 µg/ml).

4.2.3.2. Interaktion von Act D und Bestrahlung

Wie Abb. 10 sehr eindrucksvoll veranschaulicht, führt eine zweistündige Vorbehandlung mit Act D bei asynchron wachsenden HAK-Zellen zu einer ausgeprägten Strahlensensibilisierung. Der Einfluß von Act D ist dabei so nachhaltig, daß ein exponentieller Verlauf der Strahlendosiseffektkurve resultiert, ein Zeichen für die Blockierung einer begrenzten Anhäufung oder Reparatur subletalen Strahlenschadens, speziell bei niedrigen Strahlendosen. Ganz offensichtlich sind die mit Act D vorbehandelten, überlebenden, aber subletal geschädigten Zellen in der Lage, die Ausbildung einer Schulterkurve und damit die Fähigkeit zur Anhäufung subletalen Strahlenschadens vollständig zu verhindern.
Elkind u. Mitarb. (1970), die sich eingehend den Problemen einer Interaktion von Act D und Bestrahlung gewidmet haben, fanden bei chin. Hamsterzellen ähnliche Ergebnisse. Dabei ist die unterschiedliche zellzyklusspezifische Empfindlichkeit der Zellen von besonderem Interesse. Synchronisierte chin. Hamsterzellen reagieren, wie bereits beschrieben, in der späten S-Phase als auch in der G_2-Phase, bzw. G_2-Mitose-Phase, äußerst resistent auf Act D-Gaben, während sie in den anderen Zellzyklusphasen durchaus empfindlich sind. Ganz im Gegensatz hierzu wirkt Bestrahlung, wo Zellen in G_2-Phase bevorzugt sensibel reagieren. Diese Beobachtungen an chin. Hamsterzellen decken sich weitgehend mit Untersuchungen an synchronisierten menschlichen

Nierenzellen durch Scaiffee u. Brohee (1969).

Ausgehend von den oben beschriebenen Unterschieden der beiden Behandlungsmodalitäten entwickelte Elkind ein Modell zur besseren Klärung einer Interaktion zwischen Zytostatika und Bestrahlung. Er unterscheidet danach bei einer Kombination von Zytostatikum und Bestrahlung zwischen einer sich überschneidenden und einer sich ergänzenden Wirkungsweise der beiden Modalitäten bezüglich des Zellzyklus. Das Modell einer sich überschneidenden Wirkungsweise besagt, daß Bestrahlung und Medikament zum gleichen Zeitpunkt maximale und minimale Wirkungen auf die Zellzyklusphasen ausüben, d. h., werden beide Modalitäten gleichzeitig angewendet, ergibt sich eine weniger hohe Absterberate. Um eine möglichst große Wirkung zu erzielen, müssen daher die beiden Agentien in den zeitlichen Abständen gegeben werden, die es den überlebenden Zellen nach einer Behandlungsart ermöglicht, um in jene Zellzyklusphase zu gelangen, in der die andere Behandlungsart ihre maximale Wirkung entfaltet.

Haben jedoch Bestrahlung und Zytostatikum zu unterschiedlichen Zellzyklusphasen ihre maximale Wirkungen, so kann man von einer sich ergänzenden Wirkungsweise sprechen, und zwar in der Weise, daß eine gleichzeitige Behandlung eine verstärkte Wirkung hervorruft.
Bei den in dieser Arbeit aufgeführten Kombinationsversuchen wurde zwischen der Act D-Gabe und der Bestrahlung jeweils ein unterschiedlich großes behandlungsfreies Intervall eingehalten. Aus den Ergebnissen (Abb. 4 - 9) läßt sich ent-

nehmen, daß keine Wirkungsverstärkung mit zunehmendem Intervall festzustellen ist, d. h., Veränderungen der Sensibilität der Zellen sind unabhängig vom Intervall zwischen den Behandlungsmodalitäten. Dies läßt auf eine sich ergänzende Wirkungsweise zwischen Act D (0.5 µg/ml und 1.0 µg/ml) und Bestrahlung (5Gy und 10Gy) schließen. Wird beispielsweise ein Tumor mit Act D behandelt, dessen Zellen sich so verhalten wie oben beschriebene HAK-Zellen, so überleben vor allem Zellen in G_2-Mitose-Phase. Eine darauffolgende Bestrahlung hätte eine äußerst große Wirkung zur Folge - unabhängig von einer Interaktion mit intrazellulären Effekten -, da die überlebenden G_2-Mitose-Phase-Zellen relativ sensibel auf Bestrahlung reagieren. Allgemein ausgedrückt, besteht die Interaktion zwischen einem Zytostatikum und einer Bestrahlung aus zwei Komponenten, einmal die intrazelluläre Wirkung und zum anderen die Wirkung beider Modalitäten auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. Das Zusammenwirken von intrazellulären Schäden in Form einer reduzierten oder gar völlig verschwundenen Schulterkurve als Ausdruck verminderter oder totaler Blockierung einer Reparatur subletalen Strahlenschadens und eine sich ergänzende Wirkungsweise auf Zellzyklusebene gibt daher die Gewähr für eine maximale Wirkung. Act D und Strahlentherapie ist deshalb bezüglich der beschriebenen Voraussetzungen eine erfolgversprechende Kombination zur Therapie von Tumoren.

Darüberhinaus müssen allerdings Probleme Beachtung finden, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnten. Für eine Chemotherapie, als auch für eine Strahlentherapie, oder einer Kombination beider Behandlungsarten ist die Zellheterogenität eines Tumors in Bezug auf den Grad seiner Sauerstoffversorgung und seines spezifischen Zellteilungsverhaltens von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich bedürfen Ergebnisse, gewonnen an normalen, gesunden Zellen, einer differenzierten Betrachtungsweise, angesichts einer erforderlichen Bekämpfung maligner Tumorzellen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von Act D und Gammastrahlen bei HAK-Zellen zu untersuchen. Voraussetzung zur Durchführung dieser Experimente waren dabei die Ermittlung der Strahlendosiseffektkurve, bzw. der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung. HAK-Zellen, isoliert aus gesundem, menschlichen Nierentubulusepithel, gehören danach zu den resistenten Zellarten. Nach einer Bestrahlung mit Gammastrahlen, Dosisleistung 1,2 Gy/min, weisen HAK-Zellen eine typische Schulterkurve auf. Als Dosiseffektkurvenparameter ergeben sich eine D_0 von 2,3 Gy und eine Extrapolationsnummer (n) von 21. Selbst nach einer Strahlendosis von 12 Gy sind erst 90% der Zellen inaktiviert. Nach Untersuchung der Zeit-Überlebensrate-Konzentrationsbeziehung vermindert Act D die Überlebensrate von HAK-Zellen nach einer exponentiellen Abhängigkeit, sowohl von der extrazellulären Konzentration als auch von der Einwirkdauer.
Eine zweistündige Vorbehandlung der HAK-Zellen mit Act D und einer Bestrahlung nach behandlungsfreien Intervallen von 1 - 24h führt zu einer erheblichen Strahlensensibilität der Zellen. Sie äußert sich in einem vollständigen Verlust der Schulter, wobei keine signifikante Veränderung der D_0 festzustellen ist. Auf die geschilderten Veränderungen hat das Intervall zwischen den beiden Behandlungsmodalitäten keinen Einfluß.

LITERATUR

1) Alper, T., Gilles, N.E., Elkind M.M.:
The sigmoid survival curve in radiobiology.
Nature 186: 1062-1063 (1960)

2) Bacchetti S., Whitemore G.F.:
Actinomycin D: Effect on Mouse-L-Cells, Biophys.
J., 9: 1427-1445 (1969)

3) Beer J.Z., Lett J.T., Alexander P.:
Influence of temperature and medium on the
x-ray sensitivities of leukaemia cells in vitro.
Nature 199, 193-194 (1963)

4) Belli, J.A. Bonte, F.J.:
Influence of temperature on the radiation
response of mammalian cells in tissue culture,
Rad. Res. 18, 272-276 (1963)

5) Cerami, A., Reich E., Ward D.C., Goldberg J.H.:
The interaction of actinomycin with DNA. Require-
ment for the 2-amino group of purines. Proc. Nat.
Acad. Sci. 57, 1036-1042 (1967).

6) Dewey, D.L., Miller H.H.:
Effects of temperature on x-ray-induced cell
lethality and chromosomal observations. Int. J.
Rad. Biol. 18, 91-93 (1970)

7) Djordjevic B., Kim J.H., Perez A.G.:
Different lethal effects of mitomycin C and
actinomycin D during the division cycle of HeLa
cells, J.Cell Biol. 38, 477-482, (1968).

8) Elkind, M.M., Sutton H.:
x-ray damage and recovery in mammalian cells in culture, Nature 184: 1293-1295 (1959)

9) Elkind, M.M., Sutton H.:
Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of x-ray damage in surviving Chinese Hamster Cells, Rad. Res. 13.: 556-593 (1960)

10) Elkind, M.M., Whitemore G.F., Alescio, T.:
Actinomycin D: Suppression of recovery in x-irradiated mammalian cells. Science 143, 1454-1457 (1964)

11) Elkind, M.M.:
Sublethal x-ray damage and its repair in mammalian cells, Rad. Res.: 558-586 (1967)

12) Elkind, M.M., Sutton-Gilbert H., Moses, W.B., Kamper C.:
Sublethal and lethal radiation damage, Nature 214, 1088 (1967)

13) Elkind, M.M., Sakamoto K., Kamper C.:
Age-dependent toxic properties of actinomycin D and x-rays in culture of Chinese Hamster Cells, Cell Tissue Kinet. 1, 209-224, (1968)

14) Elkind, M.M., Kano E., Sutton-Gilbert H.:
Cell killing by actinomycin D in relation to the growth cycle of Chinese Hamster Cells, J. Cell Biol. Vol. 42. 366-377 (1969)

15) Elkind M.M., Sakamoto K.:
Combined effects of x-irradiation and chemo-therapeutic drugs (nitrogen mustard and actinomycin D). Front. Rad. Ther. Onc., Vol. 4, 53-75 (1969).

16) Elkind M.M.:
Some principles for a rational, cell-based development of combined radiation-drug therapy, Front. Rad. Ther. Onc., Vol. 4., 76-78 (1969)

17) Elkind M.M., Kano E.:
Actinomycin D and radiation fractionation studies in asynchronous and synchronized Chinese Hamster Cells, Rad. Res. 44, 484-497 (1970)

18) Farber, S., D'Angio G., Evans, A., et al.:
Clinical studies of actinomycin D with special reference to Wilm's tumor in children. Acad. Sci. 89: 421-425, (1960)

19) Gellert. M., Smith C.E., Neville, D., Felsenfeld, G.:
Actinomycin D binding to DNA. Mechanism and specificity. J. molec. Biol. 11, 445-457 (1965)

20) Goldberg, I.H. Rabinowitz, M.:
Actinomycin D inhibition of nucleic acid dependent synthesis of ribonucleic acid. Science 136, 315-316. (1962)

21) Goldberg, I.H. Rabinowitz, M., Reich E.:
Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. Proc. Nat. Acad. Sci.: 48, 2094 (1962)

22) Goldberg, I. H.:
Mode of action of antibiotics. II. Drugs affecting nucleic acid and protein synthesis.
American Journal Med. 39, 722-752 (1965)

23) Gursky, G.V.:
Structure of DNA-actinomycin complex
J. molec. Biol. 3, 749-757 (1969)

24) Hartmann, G., Coy, U., Kniese, G.:
Zum biologischen Wirkungsmechanismus der Actinomycine, Z. Physiol. Chem. 330, 227-233 (1962)

25) Henry M.C., Marlow M.:
Preclinical toxicologic study of actinomycin D. Canc. Chemother. Rep. Part 3 Vol. 4: 77-84 (1973)

26) Hurwitz, J., Furth, J.I., Malamy, M., Alexander, M.:
The role of desoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid by actinomycin D. and proflavin.
Proc. nat. Acad. Sci., 48, 1222-1230 (1962)

27) Kirk, J.:
The mode of action of actinomycin D. Biochem. biophys. Acta 42, 167-169 (1960)

28) Lampert F.:
Krebs im Kindesalter, Verlag Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore (1977)

29) Mauro F., Madoc-Jones, H.:
Age response of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs, Cancer Res. 30, 1397-1408 (1970)

30) Phillips T.L.:
Tissue toxicity of radiation-drug interactions. Editor: Sokol G.H., Maickel R. P.: Radiation--drug interactions in the treatment of Cancer, New York (1980)

31) Puck, T.T., Marens P.I.:
Action of x-ray on mammalian cells. J. Exp. Med. 103, 653-666 (1956)

32) Ravdin, R.G., Elkins, W.L.,:
Chemotherapy of solid tumors. Surg. Clin. Am. 40: 1641-1656 (1960)

33) Reich, E., Franklin, R.M., Shatkin, A.J., Tatum, E.L.:
Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production - Science 134, 556-557 (1961)

34) Reich, E.:
Actinomycin: correlation of structure and function of its complexes with purines and DNA. Science 143, 684 - 689 (1964)

35) Scaiffee, J.F., Brohée, H.:
An investigation of factors influencing mitotic G_2 delay in synchronous cultures of human kidney cells after x-irradiation. Canad. J. Biochem. 47, 237-249 (1969)

36) Tan, C.T., Golbey, R.B., Jap. C.L. et al.:
Clinical experience with actinomycin D, KS 2, and F_1 (KS 4). Acad. Sci. 89: 426-444 (1960)

37) Whitemore, G.F., Till J.E.:
Quantitation of cellular radiation responses. Am. Rev. Nucl. Sci. 14, 347-374 (1964)

38) Whitemore G.F., Borsa J., Bacchetti S., Graham F.:
Mammalian cell killing by inhibitors of DNA synthesis. Normal and malignant cell growth, ed. by R. Fry et al, Cancer Res. 17 (1969)

Lebenslauf

Axel Steuer,	geboren am 2. Oktober 1952 in Konstanz
Eltern:	Wolfgang und Elisabeth Steuer
1958	Umzug nach Neumünster/Schleswig-Holstein
1959 - 1961	Volksschule in Neumünster
1961 - 1963	Volksschule in Amberg/Opf.
1963 - 1969	Gregor-Mendel-Gymnasium Amberg
1969 - 197o	Gymnasium der Gemeinde Hürth--Hermühlheim/Köln
197o - 1973	Gymnasium Bad Tölz
1973	Abitur
1973 - 1974	Ableistung der Wehrpflicht
1974 - 1976	Studium der Biologie/Chemie an der LMU München
1976 - 1977	Unterbrechung des Studiums
1977	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
26.04.83	Tag der mündlichen Prüfung des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.R. Trott für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anregungen, die zum Gelingen meiner Dissertation wesentlich beitrugen, für die kritische Durchsicht des Entwurfs der Dissertation, sowie für seine Hilfe und Erfahrung, die er mir jederzeit zur Verfügung stellte.

Darüberhinaus danke ich allen Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Institutes für ihre freundliche Unterstützung und Hilfe während der Laborarbeiten.